



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123890** (13) **C2**  
(51) МПК (2021.01)  
**C07D 403/04** (2006.01)  
A61P 35/00  
**A61K 31/513** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

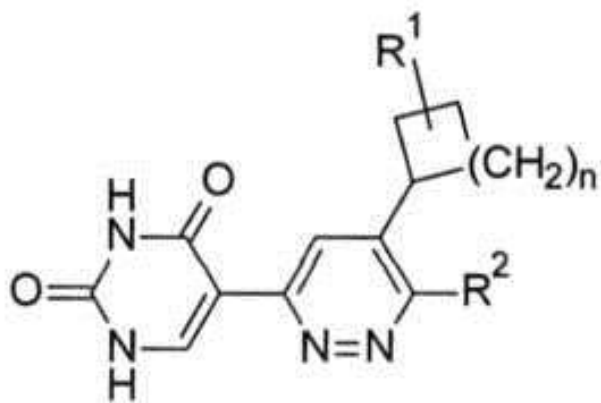
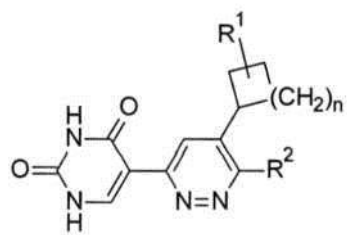
<p>(21) Номер заявки: <b>а 2020 05110</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>22.02.2019</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>17.06.2021</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>62/636,978, 62/775,553</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>01.03.2018, 05.12.2018</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.11.2020, Бюл.№ 22</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>16.06.2021, Бюл.№ 24</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2019/019074, 22.02.2019</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Даллі Роберт Дін (US), Гарсія Паредес Марія Крістіна (US), Хайнц Лоренс Джозеф II (US), Хауелл Дженніфер Марі (US), Ньороге Френк Джордж (US), Ван Янь (US), Чжао Геньши (US)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,</b> Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: <b>Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2017120508, A1, 13.07.2017 YA-PING GONG et al. Evaluation of WO2017098421: GSK's benzothiazine compounds as CD73 inhibitor filings// EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, (20171122), vol. 28, no. 2, pages 167 – 171 (abstract) RAHILA RAHIMOVA et al. Identification of allosteric inhibitors of the ecto-5'-nucleotidase (CD73) targeting the dimer interface// PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, (20180129), vol. 14, no. 1, page 1-23</p>
--	--

**(54) ІНГІБІТОРИ CD73**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується сполук 5-[5]-[2-циклоалкіл]-6-піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону або їх фармацевтично прийнятних солей та фармацевтичних композицій, які містять згадані сполуки, які інгібують активність CD73 і є придатними для лікування раку

**UA 123890 C2**



Цей винахід стосується сполук 5-[5]-[2-циклоалкіл]-6-піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону або їх фармацевтично прийнятних солей та фармацевтичних композицій, які містять згадані сполуки, які інгібують активність CD73 і є придатними для лікування раку.

CD73, також відомий як 5'-нуклеотидаза або екто-5'-нуклеотидаза (ЕС 3.1.3.5), є ферментом, який перетворює 5'-моонуклеотиди на нуклеозиди. CD73 експресується у багатьох тканинах і активується в ракових тканинах, а шлях CD73 сприяє росту пухлин, обмежуючи протипухлинний Т-клітинний імунітет через передавання сигналів рецепторів аденозину (Zhang B, Cancer Research 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L, et al., Drug Discovery Today 2017; 22: 1686-1696).

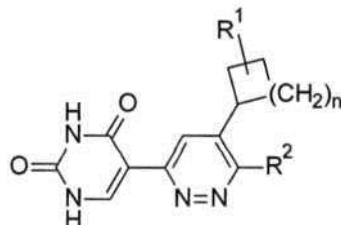
CD73-дефіцитні миші мають підвищений протипухлинний імунітет і є стійкими до досліджуваних метастазів (Stagg J, et al., Cancer Research 2011; 71: 2892-2900). Позаклітинний аденозин, утворений пухлинною CD73, накопичується в пухлинному мікросередовищі, ослабляє протипухлинний Т-клітинний імунітет (Zhang B, Cancer Research 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L, et al., Drug Discovery Today 2017; 22: 1686-1696), і пов'язаний з ухилянням пухлин від механізмів імунологічного нагляду, проліферацією, міграцією, неоваскуляризацією, метастазуванням та хіміорезистентністю пухлинних клітин (Inoue Y, et al., Oncotarget 2017; 8: 8738-8751).

Повідомлялось також, що підвищена експресія CD73 пов'язана з підвищеною імунною супресією (Jin D, et al., Cancer Res. 70: 2245-2255 (2010); Beavis PA, et al., Trends Immunol 33: 231-7 (2012); Beavis, PA, et al., Cancer Immunol Res. 3: 506-17 (2015); Loi S, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 11091-11096 (2013)).

Отже шлях CD73 чинить імуносупресивний вплив, і було висловлено припущення, що блокування шляху CD73 може бути корисним при лікуванні раку (Antonioli L, et al., Oncoimmunol. 2016; 5: e1216292, doi: 10.1080/2162402X.2016.1216292; Antonioli L, et al., Trends in Cancer 2016; 2: 95-109; Allard D, et al., Immunotherapy 2016; 8: 145-163). Інгібітори CD73 знаходяться на стадії клінічних випробувань для лікування раку (Hay CM, et al., Oncoimmunol. 2016; 5(8): e1208875; Allard D, et al., Immunotherapy 2016; 8: 145-163).

Залишається потреба у наданні альтернативних інгібіторів CD73, зокрема, для лікування раку. Зокрема, залишається потреба в доступних дрібномолекулярних інгібіторах CD73 для перорального вживання, які демонструють більш повне цільове інгібування в пухлинному мікросередовищі.

Відповідно цим винаходом надані сполуки інгібітори CD73, які можуть бути придатними для лікування раку. Цим винаходом надана сполука Формули I



де n становить 0-3;

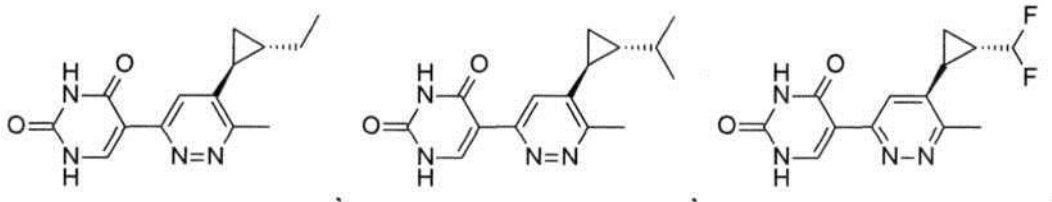
де R¹ - це -H, -F, -гем-дифтор, -гем-диметил, -C₁-₄ алкіл, -CHF₂, -CF₂CH₃ або -CH₂CH₂F;

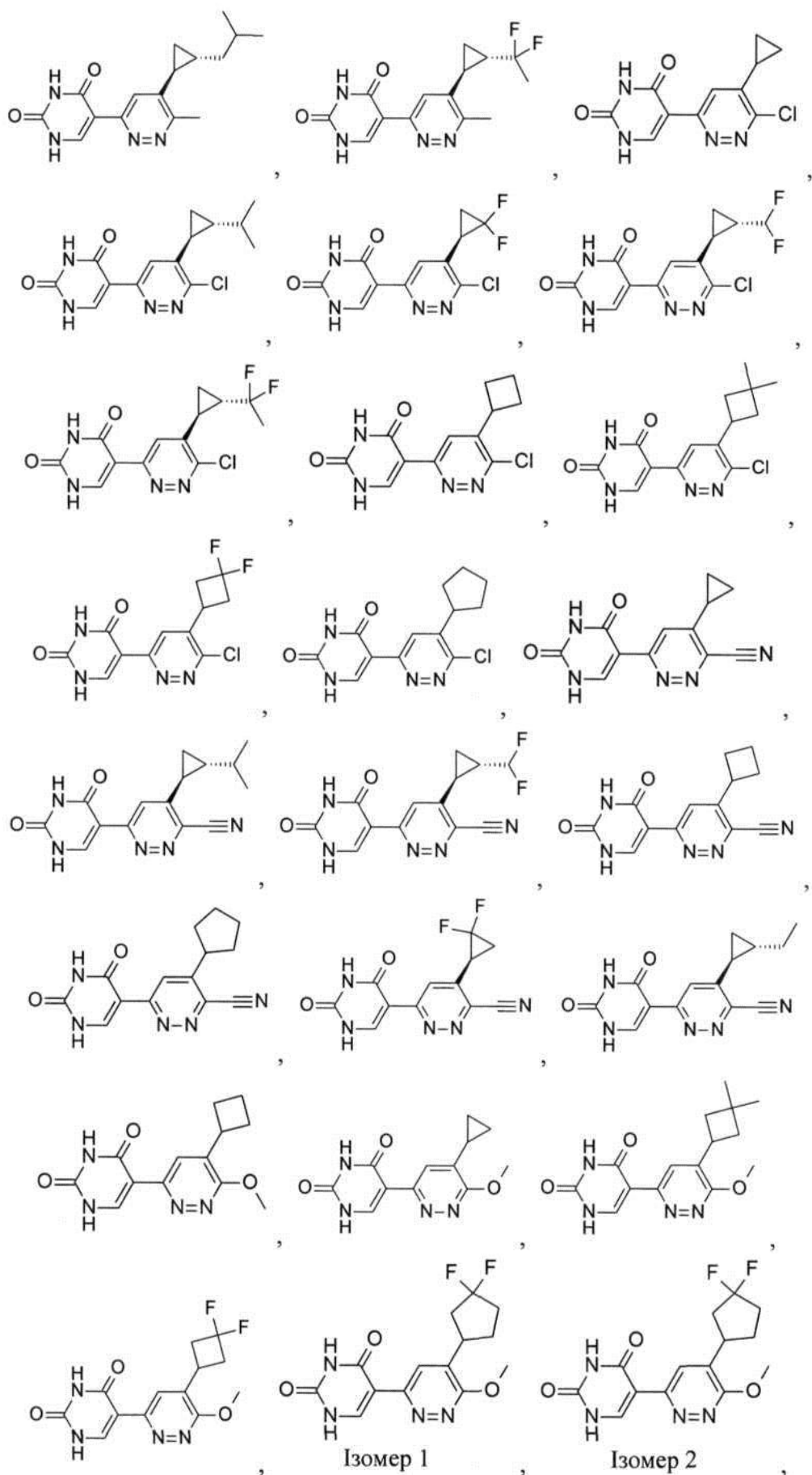
та R² вибраний з-посеред -H, -CH₃, -F, -Cl, -CN, або -OCH₃;

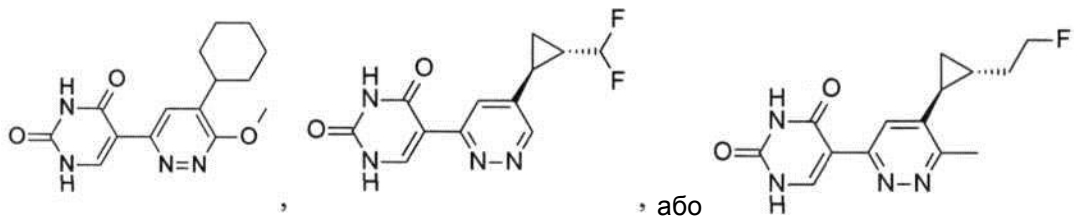
або її фармацевтично прийнятна сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу надана сполука Формули I, де n становить 0, R¹ - це -C₁-₄ алкіл, і R² - це -CH₃, або її фармацевтично прийнятна сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це

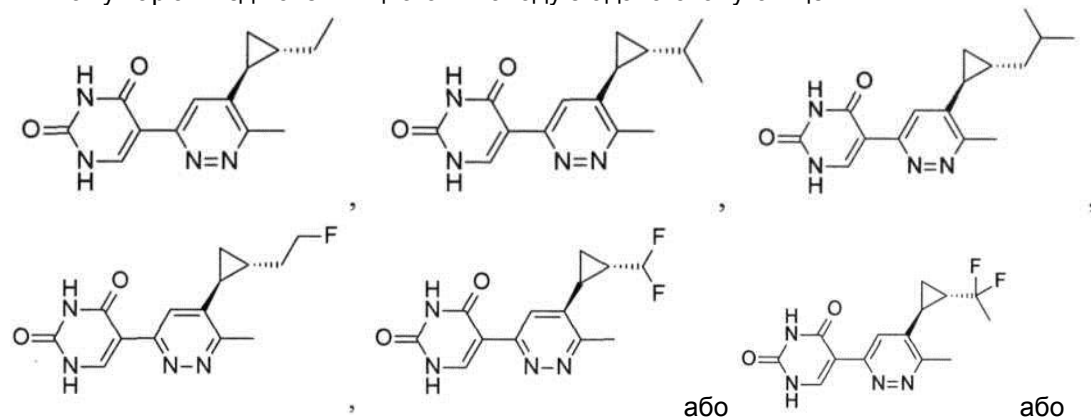






або їх фармацевтично прийнятна сіль.

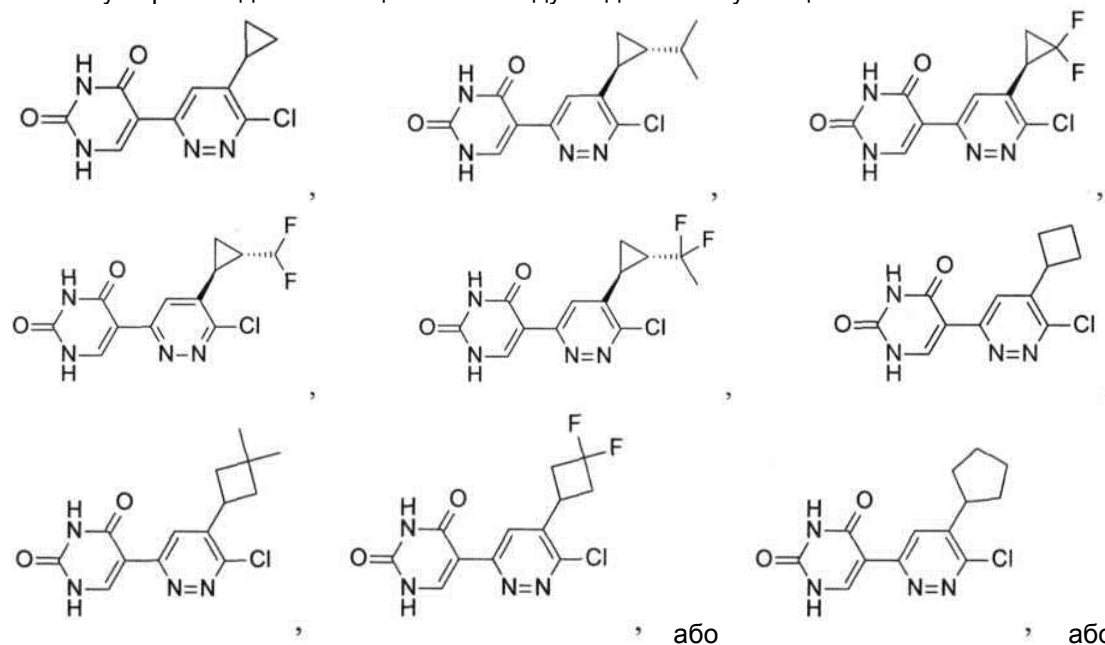
В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це



5

їх фармацевтично прийнятна сіль.

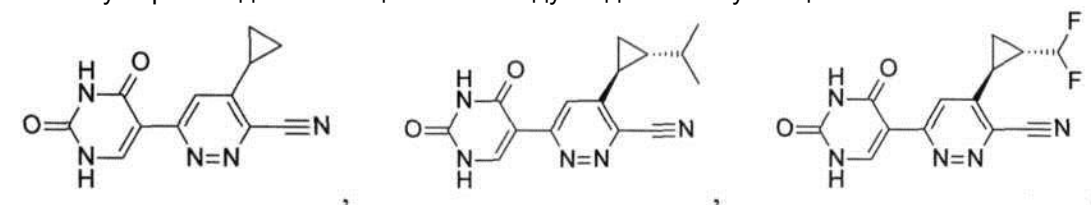
В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це

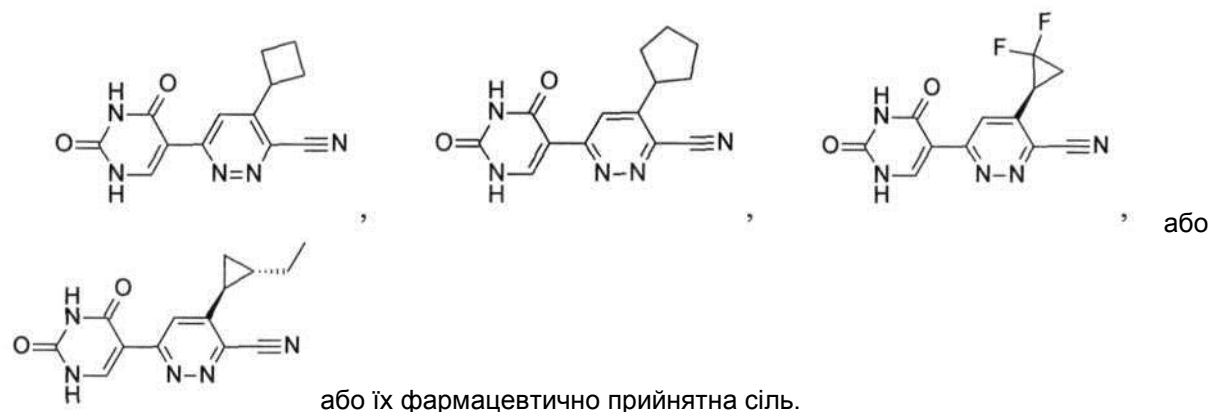


10

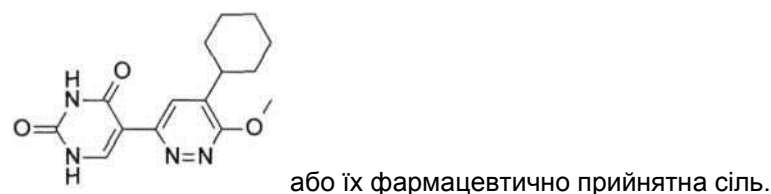
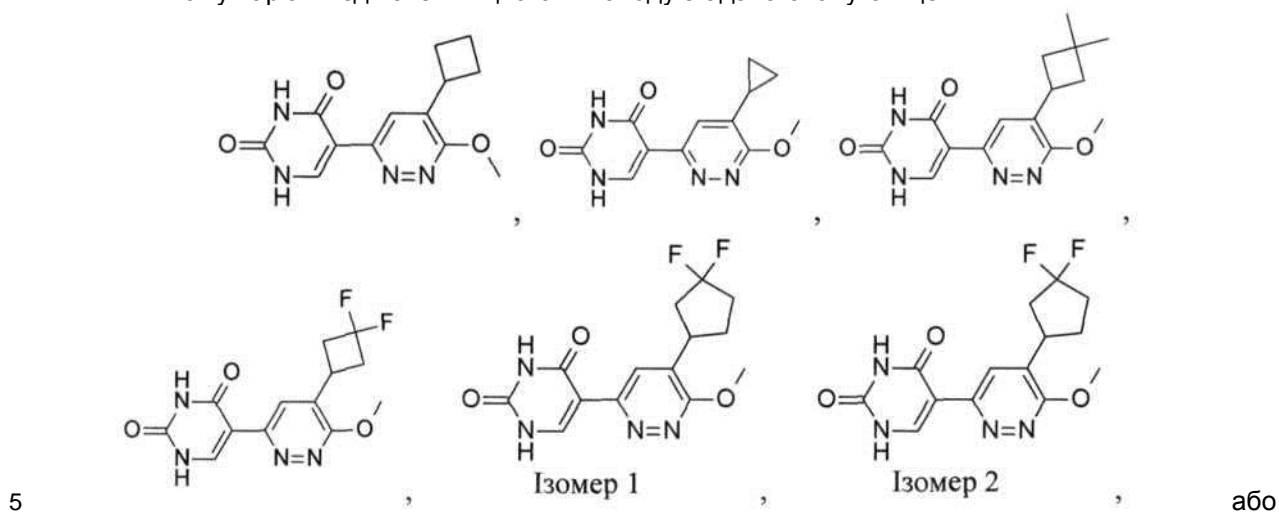
фармацевтично прийнятна сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це

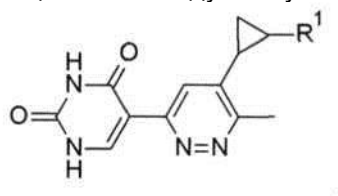
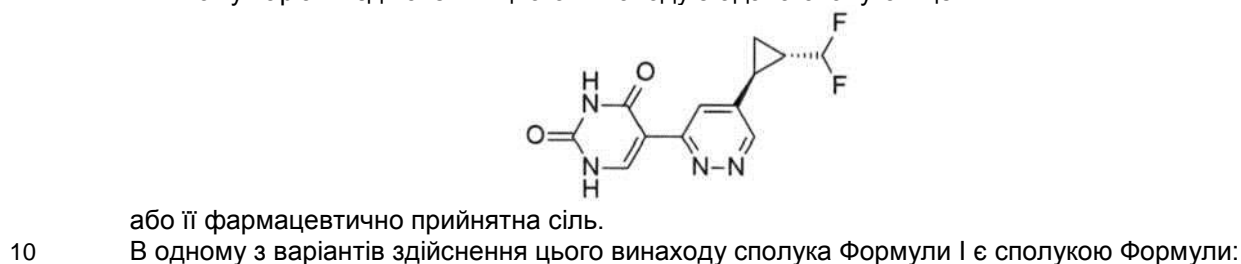




В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це

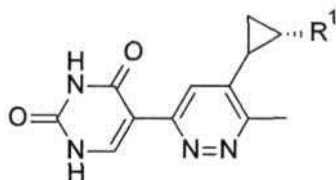


В іншому варіанті здійснення цього винаходу згадана сполука - це

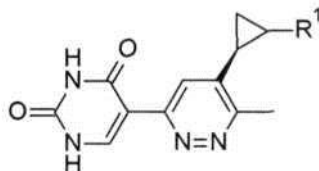


де  $R^1$  - це  $-CH_2CH_3$  або  $-CH(CH_3)_2$ , або її фармацевтично прийнятною сіллю. В іншому варіанті здійснення цього винаходу сполука Формули I є сполукою, де  $R^1$  - це  $-CH_2CH_3$ , або її фармацевтично прийнятною сіллю. В іншому варіанті здійснення цього винаходу сполука Формули I є сполукою, де  $R^1$  - це  $-CH(CH_3)_2$ , або її фармацевтично прийнятною сіллю.

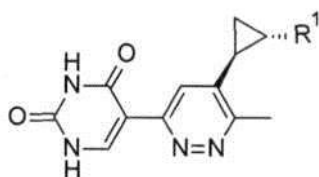
В іншому варіанті здійснення цього винаходу сполука Формули I є сполукою Формули:



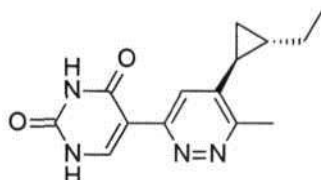
або



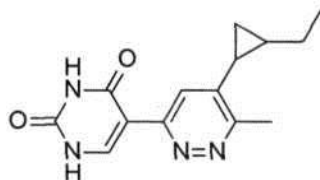
- 5 де R<sup>1</sup>- це -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> або CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, або її фармацевтично прийнятною сіллю.  
В іншому варіанті здійснення цього винаходу сполука Формули I є сполукою Формули:



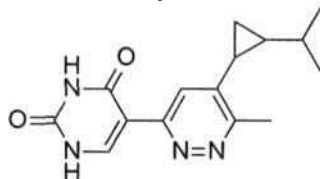
де R<sup>1</sup> - це -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> або -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, або її фармацевтично прийнятною сіллю. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука



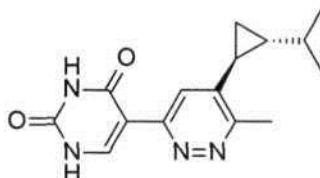
- 10 або її фармацевтично прийнятна сіль.  
В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука



або її фармацевтично прийнятна сіль.  
В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука



- 15 або її фармацевтично прийнятна сіль.  
В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука



- 20 або її фармацевтично прийнятна сіль.  
В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука, яка являє собою 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука, яка являє собою 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надана фармацевтична композиція, яка містить 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль, та один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана сполука, яка являє собою 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана фармацевтична композиція, яка містить 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон та один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діону або його фармацевтично прийнятної солі.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діону або його фармацевтично прийнятної солі.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятна сіль, для застосування в терапії.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятна сіль, для застосування в терапії.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятна сіль, для застосування в лікуванні раку.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятна сіль, для застосування в лікуванні раку.

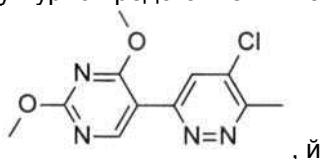
В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надана фармацевтична композиція для застосування в лікуванні раку, й ця композиція містить 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надана фармацевтична композиція для застосування в лікуванні раку, й ця композиція містить 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон або його фармацевтично прийнятну сіль.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надане застосування 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діону або його фармацевтично прийнятної солі, у виготовленні лікарського засобу для лікування раку.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом надане застосування 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діону або його фармацевтично прийнятної солі, у виготовленні лікарського засобу для лікування раку.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надане одержання та застосування 4-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазину, який може бути структурно представлений так

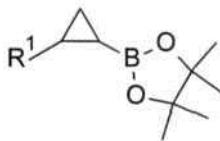


, й

який є придатним для виготовлення сполуки або лікарського засобу для лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 4-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

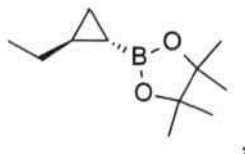


В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надане одержання та застосування 4,4,5,5-тетраметил-2-(2-заміщений циклопропіл)-1,3,2-діоксаборолану, який може бути структурно представлений так



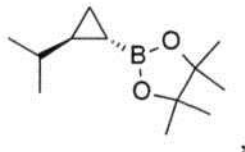
де  $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$  або  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , який є придатним для виготовлення лікарського засобу для лікування раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу  $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ . В іншому варіанті здійснення цього винаходу  $R^1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ . В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 4,4,5,5-тетраметил-2-(2-заміщений циклопропіл)-1,3,2-діоксаборолан для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надане одержання та застосування 2-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану, який може бути структурно представлений так



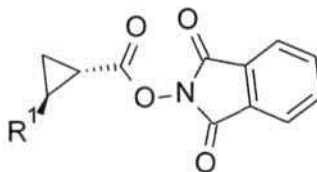
та який є придатним для виготовлення сполуки або лікарського засобу для лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 2-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом надане одержання та застосування 2-[(1S, 2S)-2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану, який може бути структурно представлений так



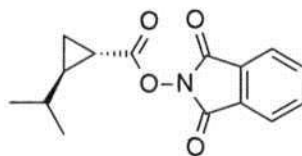
та який є придатним для виготовлення сполуки або лікарського засобу для лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий 2-[(1S, 2S)-2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий хіральний синтез 2-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану, із застосуванням (1,3-діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбоксилату, який може бути структурно представлений так



де  $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$  або  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , та який є придатним для виготовлення сполуки або лікарського засобу для лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий (1,3-діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбоксилат для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий хіральний синтез 2-[(1S, 2S)-2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану, із застосуванням (1,3-діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилату, який може бути структурно представлений так



та який є придатним для виготовлення сполуки або лікарського засобу для лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий (1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилат для застосування у виготовленні сполуки або лікарського засобу.

Білок CD73 експресується в багатьох тканинах, в тому числі в головному мозку, щитовидній залозі, надниркових залозах, кістковому мозку, лімфатичних вузлах, мигдаликах, селезінці, серцевому м'язі, гладенькій мускулатурі, легенях, носоглотці, печінці, жовчному міхуру, підшлунковій залозі, слинній залозі, слизовій оболонці рота, стравоході, шлунку, дванадцятипалій кишці, тонкій кишці, товстій кишці, прямій кишці, нирках, сечовому міхурі, яєчках, передміхуровій залозі, маткових трубах, піхві, молочних залозах, шийці матки, матці, ендометрії, яєчниках, м'яких тканинах та шкірі ([proteintlas.org/ENSG00000135318-NT5E/tissue](http://proteintlas.org/ENSG00000135318-NT5E/tissue)). CD73 надекспресується в пухлинах численних типів (Antonioli L, et al., *Nat. Rev. Cancer* 13, 842-857 (2013); Antonioli L, et al., *Trends Cancer* 2: 95-109 (2016)). CD73 також експресується в нормальній та патологічній гепатобіліопанкреатичній тканині людини, включаючи гепатоцити, аденокарциному протоків підшлункової залози та позапечінкову холангіоцелюлярну карциному (Sciarra, A., et al., *Cancer Immunol Immunother* 2019; doi.org/10.1007/s00262-018-2290-1).

Підвищена експресія та активність CD73 пов'язана з інвазивністю та метастазами пухлин і меншим часом виживання пацієнта (Jin D, et al., *Cancer Research* 2010; 70: 2245-2255). Підвищену експресію CD73 зв'язують з поганим прогнозом (Inoue K et al., *Oncotarget* 8: 8738-8751 (2017); Turcotte K, et al., *Cancer Res.* 5: 4494-4503 (2015); Lu YT, et al., *World J. Gastroenterol.* 19: 1912-1918 (2013); Wu XR, et al., *J. Surg. Oncol.* 106: 130-137 (2012); Buisseret S, et al., *Ann. Oncol.* 29: 1056-1062 (2017); Leclerc R, et al., *Clin. Cancer Res.* 22: 158-66(2016)).

Експресія CD73 при тричі негативному раку молочної залози пов'язана з гіршими клінічними наслідками та підвищенням стійкості до хіміотерапії антрацикліном (Allard B, et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 2014; 18: 863-881). CD73 зв'язують з поганим прогнозом при плоскоклітинному раку голови та шиї (Ren Z-H, et al., *Oncotargets* 2016; 7: 61690-61702). Експресія CD73 також пов'язана з прогресуванням нирковоклітинного раку (Yu Y, et al., *Oncol. Lett.* 2015; 9: 2485-2494).

CD73 надекспресується в пухлинах ендометрію Aliagas E, et al., *Mediators of Inflammation* 2014; doi: 10.1155/2014/509027), пухлинах тканини передміхурової залози (Leclerc BG, et al., *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 158-166), в тканині недрібноклітинного раку легенів (Inoue Y, et al., *Oncotarget* 2017; 8: 8738-8751). Повідомлялось, що CD73 надекспресується в пухлинах, включаючи рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак яєчників, рак шлунка та рак жовчного міхура (Gao Z-W та Zhang H-Z, *Biomed Res. Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654). Повідомлялось, що CD73 надекспресується в лініях ракових клітин, включаючи лінії клітин гліобластоми, меланоми, раку молочної залози, раку яєчників, медулобластоми та раку сечового міхура (Gao Z-W та Zhang H-Z, *Biomed Res.Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654).

Повідомлялось, що генерований CD73 аденозин ослабляє імунну реакцію та знижує виживаність у хворих на рак яєчників (Gaudreau P-O et al., *Oncoimmunology* 2016; 5 (5): el 127496).

Повідомлялось, що *in vivo* блокада CD73 селективним інгібітором CD73  $\alpha,\beta$ -метиленаденозин-5'-дифосфатом зменшує ріст пухлин у сингенних мишей, яким підшкірним шляхом були введені пухлинні клітини EG7 (лімфома), MC38 (товста кишка), AT-3 (молочна залоза) та B16F10 (меланома) (Stagg J, et al., *Cancer Research* 2011; 71: 2892-2900; Forte G, et al., *J. Immunol.* 2012; 189: 2226-2233). Повідомлялось, що терапія антитілами проти CD73 інгібує ріст та метастазування пухлин молочної залози (Stagg J, et al., *PNAS* 2010; 107: 1547-1552; TerpMG, *J. Immunol.* 2013; 191:4165-4173).

Крім того, повідомлялось, що у пацієнтів, які страждають на рак, підвищується активність аденозину та ферменту CD73 (Huang N, et al., *Cancer Res.* 75:1538 (2015)), а пацієнти, які не відповідають на інгібітори імунної контрольної точки, мають більш високий рівень аденозину, ніж ті, хто реагує (Giannakis HX et al., *J. Clin. Oncol.* 35: 15 Suppl. 3036-3036(2017)).

Повідомлялось, що активацію онкогенів та втрата рецепторів естрогенів пов'язують з посиленою експресією CD73 (Reinhardt J, et al., *Cancer Res.* 77: 4697-4709 (2017); Spsychala J, et al., *Clin. Cancer Rs.* 10:708-17 (2004); Ascierto and McArthur J., *Transl. Med.* 15: 173 (2017); Young A, et al., *Cancer Res.* 77:4684-4696 (2017)).

До суб'єктів, які можуть одержати позитивний результат від лікування інгібіторами CD73, належать ті суб'єкти, які мають пухлини, стійкі або рефрактерні до інгібіторів PD1/PDL-1, такі як недрібноклітинний рак легенів, рак сечового міхура та меланома; ті суб'єкти, які страждають на рак, спричинений мутацією EGFR/BRAF/Kras, такий як недрібноклітинний рак легенів, рак сечового міхура, меланома, рак ободової кишки та підшлункової залози; ті суб'єкти, які страждають на естроген-рецептор негативний рак, такий як тричі негативний рак молочної залози; ті суб'єкти, які мають високий рівень експресії CD73, тобто такі, які страждають на рак підшлункової залози та рак ободової та прямої кишки. Якщо бажано, такий суб'єкт може бути вибраний для терапії сполукою, розкритою в цьому описі, або її фармацевтично прийнятною сіллю, виходячи з наявності визначених імуногістохімічним методом високих рівнів експресії CD73 в пухлинах суб'єктів; або виходячи з наявності у пухлинах суб'єктів мутацій EGFR та BRAF, які виявлені методами RT-PCR (ПЦР у реальному часі); або беручи до уваги втрату рецептора естрогенів в пухлинах суб'єктів, яку було виявлено із застосуванням імуногістохімічного аналізу або RT-PCR аналізу; або виходячи з наявності високого рівня аденозину та AMP (аденозин-5'-монофосфат) у пухлинах суб'єктів або плазмі, які були виявлені методом LC-MS (рідинна хроматографія-мас-спектрометрія). Для фармакодинамічного оцінювання наведене в цьому описі *ex vivo* дослідження на основі LC-MS може бути застосоване для визначення впливу інгібітору CD73 на конверсію AMP в аденозин в крові.

Цим винаходом також наданий спосіб лікування раку у пацієнта, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

В цьому описі цим винаходом також наданий спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишки, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданий рак молочної залози - тричі негативний рак молочної залози. В іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак легенів - це недрібноклітинний рак легенів. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу пацієнтом є той, у кого визначена активність CD73 у сироватці крові. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, "визначення активності CD73" означає виявлення наявності активності CD73. Методи визначення рівня експресії CD73 або активності CD73 відомі фахівцям у цій галузі, наприклад, дивись S Morello, et al., J. Trans. Med. 2017; 15: 244. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, "визначення активності CD73" означає кількісне визначення рівня перетворення AMP на аденозин за допомогою CD73, і у цьому описі наведене дослідження на основі LC-MS, яке полегшує кількісне визначення рівня активності CD73.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу пацієнтом є той, у кого була визначена експресія CD73 в тканині. В іншому варіанті здійснення цього винаходу цією тканиною є пухлинна тканина. Методи визначення рівня експресії CD73 в тканині відомі фахівцям в цій галузі, наприклад, із застосуванням вестерн-блотингу або імуногістохімії (XR Wu, et al., J. Surg. Oncol. 2012; 106: 130-137).

Цим винаходом також наданий спосіб, який включає визначення експресії CD73 в тканині, одержаній від пацієнта, якому була введена сполука за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятна сіль. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданою тканиною є пухлинна тканина.

Цим винаходом також наданий спосіб, який включає визначення активності CD73 у сироватці крові, одержаної від пацієнта, якому була введена сполука, що відповідає розкритий в цьому описі сполуці Формули I, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цей спосіб є чутливим, не потребує біопсії пухлини, не потребує антитіл або імуногістохімії, полегшує кількісне визначення активності CD73 (наприклад, спрощенням обчислення EC<sub>50</sub>). В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, спосіб крім того включає дослідження активності CD73 із застосуванням радіоактивно міченого аденозинмонофосфату (AMP) і визначення концентрації AMP, міченого радіоактивною міткою, із застосуванням мас-

спектрометрії. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, радіоактивно міченим АМР є  $^{13}\text{C}5\text{-}^{15}\text{N}5\text{-AMP}$ .

В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданий спосіб включає (а) введення сироватки, одержаної від пацієнта, в кожне з множини вмістищ (наприклад, мікротитраційний планшет), сконфігурованої так, щоб вміщати розчини з різними концентраціями сполуки, яку вводять пацієнту, (b) введення  $^{13}\text{C}10\text{-}^{15}\text{N}5\text{-AMP}$  в кожне вмістище зі згаданої множини вмістищ, (c) інкубування згаданої множини вмістищ в умовах, що полегшують перемішування (наприклад, струшування), (d) центрифугування згаданої множини вмістищ, (e) перенесення супернатанту з кожного вмістища в нове відповідне вмістище, (f) введення екстракційного розчину, що містить внутрішній стандарт, в кожне зі згаданих нових відповідних вмістищ, (g) центрифугування цих нових відповідних вмістищ, (h) перенесення супернатанту з кожного нового відповідного вмістища у відповідне вмістище для дослідження, (i) дослідження супернатанту у кожному відповідному вмістищі для дослідження на  $^{13}\text{C}10\text{-}^{15}\text{N}5\text{-аденозин}$ ,  $^{13}\text{C}10\text{-}^{15}\text{N}4\text{-інозин}$  та  $^{15}\text{N}4\text{-гіпоксантин}$  із застосуванням LC/MS, як наведено у цьому описі ("Мас-спектроскопія на аденозин і очищення аденозину") та (j) обчислення  $\text{EC}_{50}$ . В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон. В варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, внутрішнім стандартом є  $^{13}\text{C}5\text{-AMP}$ ,  $^{13}\text{C}5\text{-аденозин}$ ,  $^{15}\text{N}4\text{-інозин}$  та  $^{13}\text{C}5\text{-гіпоксантин}$ .

Цим винаходом також надане застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в терапії. В одному з варіантів здійснення цього винаходу терапією є лікування раку. В іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишки, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданий рак молочної залози - це тричі негативний рак молочної залози. В іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак легенів - це недрібноклітинний рак легенів. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон.

Цим винаходом також надане застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишки, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок. В одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданий рак молочної залози - це тричі негативний рак молочної залози. В іншому варіанті здійснення цього винаходу згаданий рак легенів - це недрібноклітинний рак легенів. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома протипухлинними засобами. До необмежувальних прикладів протипухлинних засобів належать рамусирумаб (ramucirumab), нецитумумаб (necitumumab), оларатумаб (olaratumab), гемцитабін (gemcitabine), пеметрексед (pemetrexed), галунісертіб (galunisertib), абемацикліб (abemaciclib), гефітиніб (gefitinib), вемурафеніб (vemurafenib), дабрафеніб (dabrafenib), траметиніб (trametinib), цисплатин (cisplatin), карбоплатин (carboplatin), дакарбазин (dacarbazine), ліпосомальний доксорубіцин, доцетаксел (docetaxel), циклофосфамід і доксорубіцин (doxorubicin), навелбін (navelbine), ерібулін (eribulin), паклітаксел (paclitaxel), зв'язані з білками частинки паклітаксела для ін'єкційних суспензій, іксабепілон (ixabepilone), капецитабін (capecitabine), FOLFOX (лейковорин (leucovorin), фторурацил (fluorouracil) та оксаліплатин (oxaliplatin), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил та іринотекан (irinotecan), цетуксимаб (cetuximab), інгібітор EGFR (рецептор епідермального фактору росту), інгібітор Raf (білок-регулятор експресії  $\alpha$ -фетопротеїна), інгібітор B-Raf, інгібітор сигнального шляху ERK, інгібітор CDK4/6, інгібітор індоламін-2,3-діоксигенази, інгібітор TGF $\beta$  (фактор некрозу пухлин- $\beta$ ) та інгібітор рецептора TGF $\beta$ .

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі сполуки Формули I або її

фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома імунонкологічними засобами. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданий імунонкологічний засіб - це антитіло проти PD-1, антитіло проти PD-L1, агоністичне антитіло проти CD 137 або антитіло проти CTLA4. До

5 необмежувальних прикладів імунонкологічних засобів належать ніволумаб (nivolumab), іпілімумаб (ipilimumab), підилізумаб (pidilizumab), пембролізумаб (pembrolizumab), тремелімунаб (tremelimumab), урелумаб (urelumab), лірілумаб (lirilumab), атезолізумаб (atezolizumab), дурвалумаб (durvalumab) та антитіло проти PD-L1 LY3300054 (послідовності важкого та легкого ланцюгів якого представлені у WO 2017/034916 та US 2017/0058033 як послідовності SEQ ID

10 NO: 10 та SEQ ID NO: 11, відповідно). В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим імунонкологічним засобом є антитіло проти PD-1. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим імунонкологічним засобом є антитіло проти PD-L1. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон і імунонкологічним засобом є LY3300054.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування недрібноклітинного раку легенів, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іншим засобом. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому

20 віддають перевагу, згаданим іншим засобом є осімертиніб (osimertinib), цетуксимаб (cetuximab) або абемацикліб (abemaciclib). В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є осімертиніб. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є цетуксимаб. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є абемацикліб.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування меланоми, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іншим засобом. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим

30 іншим засобом є інгібітор BRAF, антитіло проти PD-1 або антитіло проти PD-L1. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є інгібітор BRAF. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є антитіло проти PD-1. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є антитіло проти PD-L1. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, антитілом проти PD-L1 є LY3300054. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон, та згаданий

35 інший засіб, яким є антитіло проти PD-L1, - це LY3300054.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку ободової і прямої кишки, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі

40 сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іншим засобом. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є абемацикліб. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон, та згаданим іншим засобом є абемацикліб.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку підшлункової залози, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі

45 сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іншим засобом. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим іншим засобом є абемацикліб. В іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон, та згаданим іншим засобом є абемацикліб.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування тричі негативного раку молочної залози, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі

50 сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з іншим засобом. В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука - це 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон.

Цим винаходом також наданий спосіб пригнічення ферментативної активності CD73 у пацієнта, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості сполуки

60 Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. Цим винаходом також наданий спосіб

інгібування перетворення AMP на аденозин у пацієнта, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу цим винаходом наданий спосіб лікування раку, що включає введення ефективної кількості розкритої в цьому описі сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі одночасно, окремо або послідовно в комбінації з одним або декількома засобами, які модулюють аденозин. До необмежувальних прикладів засобів, що модулюють аденозин, належать антитіло проти CD73 та антагоніст рецептора аденозину.

Цим винаходом також надана фармацевтична композиція, яка містить сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або наповнювачами. Крім того, цим винаходом наданий спосіб одержання фармацевтичної композиції, який включає змішування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або наповнювачами. Цей винахід також охоплює нові проміжні продукти та процеси синтезу сполук Формули I.

Як вжито вище і протягом усього опису цього винаходу, наведені нижче терміни, якщо не зазначено інше, мають тлумачитися як такі, що мають такі значення:

"Фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач" є середовищем, загальноприйнятим в цій галузі, для доставки біологічно активних засобів ссавцям, наприклад, людям.

Терміни "курс лікування", "лікування", "лікувати" тощо означають уповільнення або звертання прогресування розладу. Ці терміни також охоплюють полегшення тяжкості симптомів, поліпшення, ослаблення, усунення або зменшення одного або декількох симптомів розладу або стану, навіть якщо згаданий розлад або стан фактично не усунено, і навіть якщо прогресування згаданого захворювання або стану само по собі не уповільнюється або не звертається.

"Ефективна кількість" означає таку кількість сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі, або фармацевтичної композиції, що містить сполуку за цим винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль, яка буде спричинювати біологічну або медичну відповідь або чинити бажаний лікарем терапевтичний вплив на пацієнта. В одному з варіантів здійснення цього винаходу сполука або її фармацевтично прийнятна сіль інгібує перетворення AMP на аденозин в *in vitro* або *ex vivo* дослідженні ферменту CD73. В іншому варіанті здійснення цього винаходу сполука або її фармацевтично прийнятна сіль інгібує перетворення AMP на аденозин в цільній мишачій крові, одержаній від тварин, які одержували різні дози сполуки.

"Гем-дифтор" відноситься до двох атомів фтору, зв'язаних з одним атомом вуглецю.

"Гем-диметил" відноситься до двох метильних груп, зв'язаних з одним атомом вуглецю.

У значенні, вживаному у цьому документі, термін "пацієнт" відноситься до людини.

Ефективна кількість може бути легко визначена лікуючим діагностом, як фахівцем в цій галузі, шляхом застосування відомих методик і вивчення результатів, одержаних за аналогічних обставин. При визначенні ефективної кількості для пацієнта лікуючим діагностом до уваги береться ряд факторів, в тому числі, але не обмежуючись ними: особливості пацієнта; його розмір, вік і загальний стан здоров'я; конкретне наявне захворювання або розлад; ступінь ураження або тяжкість захворювання або розладу; реакція конкретного пацієнта; конкретна призначена для введення сполука; спосіб введення; характеристики біодоступності призначеного для введення препарату; вибрана схема приймання лікарського засобу; застосування супутнього лікарського засобу; та інші відповідні обставини.

Сполуки за цим винаходом можна використовувати в широкому діапазоні доз. Наприклад, дози на добу зазвичай знаходяться в межах від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 50 мг/кг маси тіла.

Сполуки за цим винаходом переважно виготовляють у вигляді фармацевтичних композицій, які вводять будь-яким шляхом, який робить згадану сполуку біодоступною, включаючи пероральний, внутрішньовенний та трансдермальний шляхи. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, такі композиції призначені для перорального введення. Такі фармацевтичні композиції та способи їх одержання добре відомі в цій галузі. (Дивись, наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Фахівцю буде зрозуміло, що сполуки за цим винаходом здатні утворювати солі. Сполуки за цим винаходом містять основні гетероцикли і, відповідно, реагують з будь-якою з ряду неорганічних та органічних кислот з утворенням фармацевтично прийнятних солей. Такі фармацевтично прийнятні солі, одержані додаванням кислоти, та загальна методика їх

одержання добре відомі в цій галузі. Дивись, наприклад, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2008)).

"Фармацевтично прийнятні солі" або "фармацевтично прийнятна сіль" вживається по відношенню до нетоксичної, неорганічної та органічної солі або солей сполуки за цим винаходом (S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, January 1977).

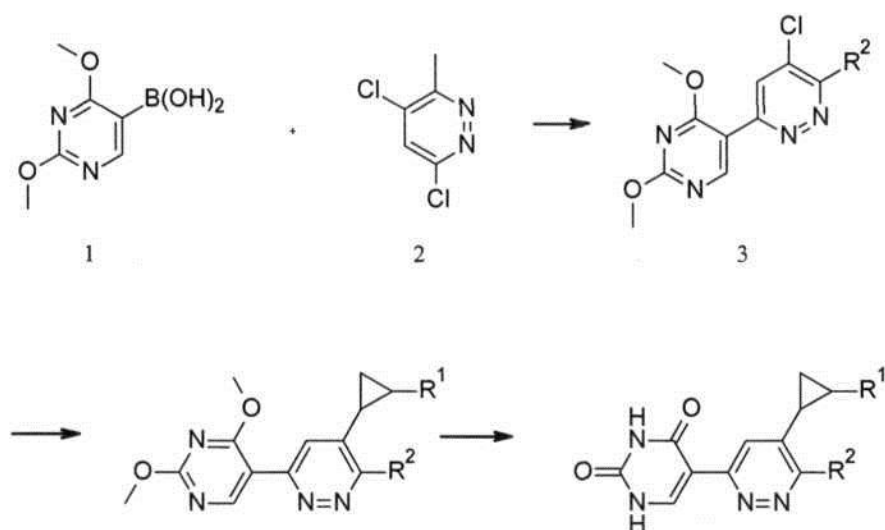
Позначка "ізомер 1" у назві сполуки означає, що відповідний проміжний хімічний продукт або сполука за цим винаходом є першим або першою з двох елюйованих енантіомерів, коли суміш пари енантіомерів відокремлюється хіральною хроматографією в умовах, описаних у наведеному нижче розділі "Препаративні методики та Приклади". Позначка "ізомер 2" у назві сполуки означає, що відповідний проміжний хімічний продукт або сполука за цим винаходом є другим або другою з двох елюйованих енантіомерів, коли суміш пари енантіомерів відокремлюється хіральною хроматографією в умовах, описаних у наведеному нижче розділі "Препаративні методики та Приклади".

Сполуки за цим винаходом можуть бути одержані за способами синтезу, добре відомими і визнаними в цій галузі. Прийнятні реакційні умови для етапів цих реакцій добре відомі в цій галузі, і відповідні заміни розчинників і сореагентів знаходяться в межах компетенції фахівців в цій галузі. Аналогічно, фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що синтетичні проміжні продукти можуть бути виділені та/або очищені різними відомими методами за необхідності або за бажанням, і що часто буде можливо використовувати різні проміжні продукти безпосередньо на подальших етапах синтезу з незначним очищенням або зовсім без очищення. Крім того, фахівець буде усвідомлювати, що в деяких умовах порядок введення складових не є критичним. Конкретний порядок етапів, необхідних для одержання сполук за даним винаходом, залежить від конкретної сполуки, що синтезують, вихідної сполуки та відносної відповідності заміщених складових, що добре розуміється кваліфікованим хіміком. Всі замісники, якщо не вказано інше, відповідають наведеному вище визначенню, і всі реагенти є добре відомими і визнаними в цій галузі.

У значенні, вживаному у цьому документі, наведені нижче терміни мають вказані значення: "ACN" означає ацетонітрил; "DAST" означає трифторид діетиламіносульфуру, "DCM" означає дихлорметан; "DMAP" означає 4-диметиламінопіридин; "dmso" або "DMSO" означає диметилсульфоксид; "ee" означає енантіомерний надлишок; "ES/MS" означає мас-спектрометрію з електророзпилюванням; "EtOAc" означає етилацетат; "Et<sub>2</sub>O" означає діетиловий ефір; "FBS" означає ембріональну бичачу сироватку; "GC-MS" означає газову хроматографію-мас-спектрометрію; "HBSS" означає збалансований сольовий розчин Хенкса; "IC<sub>50</sub>" означає напівмаксимальну інгібуючу концентрацію; "LAH" означає алюмогідрид літію; "LC-ES/MS" означає рідинну хроматографію/мас-спектрометрію з електророзпилюванням; "MS" означає мас-спектрометрію; "MeOH" означає метанол; "MTBE" означає метил-трет-бутиловий ефір; "NBuLi" означає n-бутиллітій; "nm" означає нанометр або нанометри; "ЯМР" означає ядерний магнітний резонанс; "OAc" означає ацетат; "psi" означає фунти на квадратний дюйм; "RT" означає кімнатну температуру або температуру навколишнього середовища; "SCX" означає сильний катіонний обмін; "SFC" означає надкритичну флюїдну хроматографію; "SNAr" означає нуклеофільну ароматичну заміну; "TEA" означає триетиламін; "THF" означає тетрагідрофуран; "tR" означає час утримування; "мас." відноситься до масових пропорцій в розчині.

Сполуки за цим винаходом можуть бути синтезовані так, як показано на наведених далі схемах.

Схема 1



Формула Ia

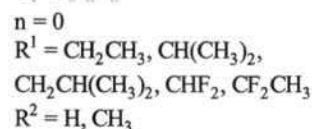
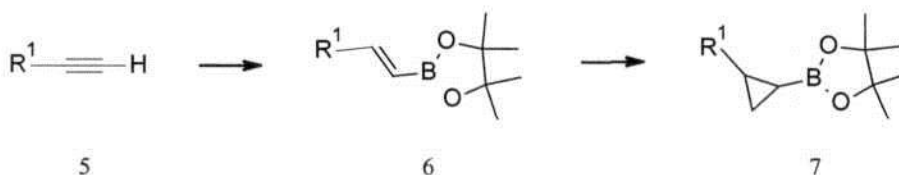


Схема 1 описує одержання сполуки Формули Ia. Із застосуванням загальновідомих умов реакції Сузукі, наявна у продажу (2,4-диметоксипіримідин-5-іл)боронова кислота 1 може бути сполучена з 4,6-дихлор-3-метилпіридазином. Для одержання сполуки 4 може бути проведена подальша реакція сполучення Сузукі хлорвмісної складової 3 з відповідно заміщеним транс-циклопропілборонатом. Фахівець буде усвідомлювати, що енантимери сполуки 4 можуть бути відокремлені із застосуванням методів хірального розділення, добре відомих в цій галузі. Сполуки Формули Ia можуть бути одержані шляхом деблокування метоксигруп у сполуці 4 за великою кількістю умов деметилування, добре описаних у цій галузі.

Схема 2



Формула II

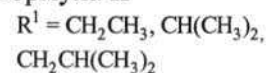


Схема 2 описує складні боронові ефіри циклопропілу, необхідні для одержання сполук Формули II. Фахівець усвідомлює, що для одержання алкенілборонату 6, гідроборування відповідно заміщеного алкіну 5 може здійснюватись за великою кількістю умов, особливо в присутності каталізатора на основі перехідних металів, таких як Cu або Zr. Для одержання відповідно заміщеного транс-циклопропілборонату 7 згаданий алкенілборонат може бути підданий циклопропануванню у стабілізованих умовах карбеноїдного типу, добре відомих у цій галузі, таких як циклопропанування Сіммонса-Сміта, реакція Корі-Чайковського та спосіб циклопропанування діазометаном (або діазосполуками), як з (наприклад, Cu, Pd, або Ni), так і без (наприклад, термічно або фотохімічно) каталізаторів на основі перехідних металів. Фахівець буде усвідомлювати, що термодинамічно переважним продуктом циклопропанування буде суміш транс-енантимерів сполуки 7.



Схема 3

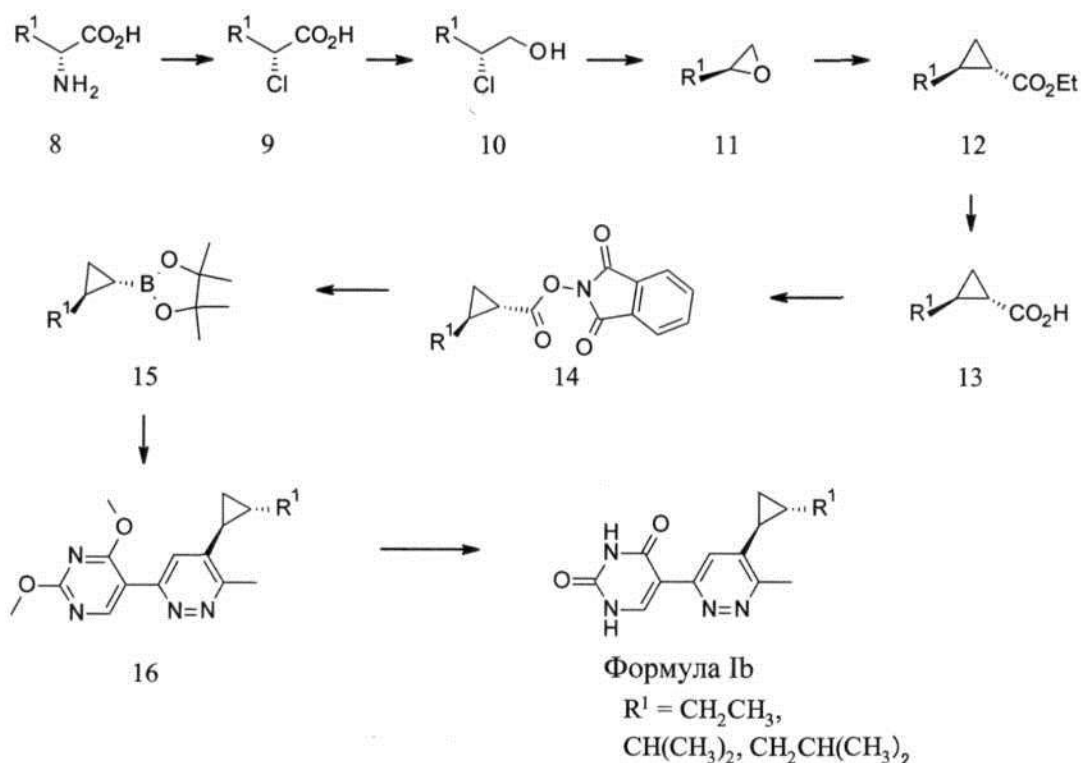
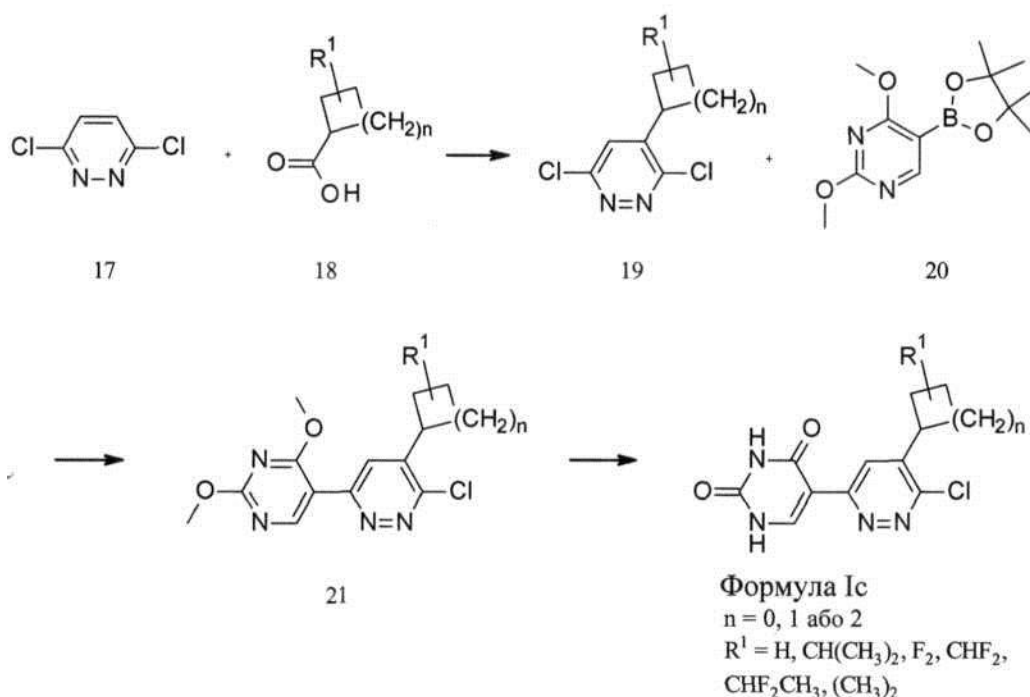


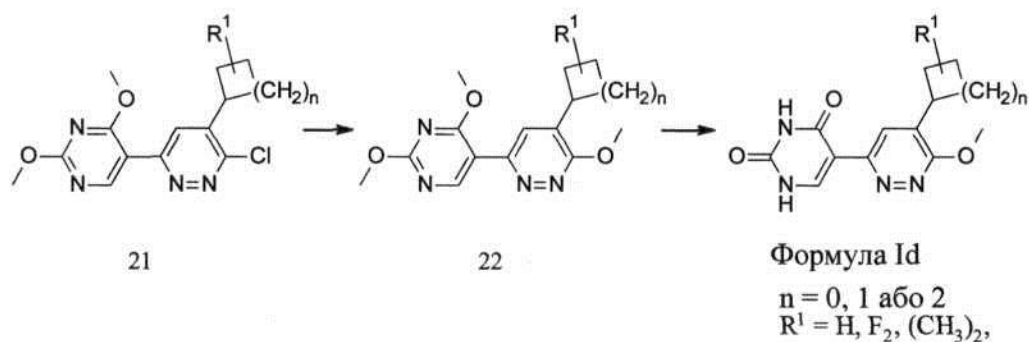
Схема 3 описує хіральний синтез сполук Формули Ib. Деазотування відповідно заміщеної амінокислоти 8 в модифікованих умовах реакції Зандмейєра (Sandmeyer) (радикал-нуклеофільне ароматичне заміщення (S<sub>N</sub>Ar)) для одержання сполуки 9 є добре відомим в цій галузі. Подальше відновлення до алкоголю 10 може бути здійснено з використанням великої кількості відомих в цій галузі відновлювачів, в тому числі гідридів алюмінію та диборану. Циклізація до хіального епоксиду 11 в основних умовах добре описана в цій галузі. Стереоселективна реакція Хорнера-Вадсворта-Еммонса може бути застосована шляхом оброблення хіального епоксиду 11 відповідним фосфонатним складним ефіром (наприклад, етил-2-діетоксифосфорилацетатом або триетилфосфоноацетатом) та відповідною основою (наприклад, алкіллітєм, алкоксидами металів або гідридами металів) для одержання транс-циклопропанової похідної 12 (Дивись, наприклад, L. Delhayе; A. Merschaert; P. Delbeke; W. Brione. Org. Proc. Res. & Dev. 2007, 11, 689-692). Гідроліз сполуки 12 до відповідної кислоти 13 може бути здійснений за великої кількості основних умов, добре описаних у цій галузі. Подальше сполучення кислоти 13 з відповідно заміщеним N-гідроксифталімідом для одержання сполуки 14 з використанням придатного кислотоактивувального реагенту, наприклад, карбонілдіімідазолу, у присутності м'якої ненуклеофільної основи, добре описано в цій галузі. Декарбоксилювальне борування N-гідроксифталімідного складного ефіру 14 може бути здійснено за багатьох умов, відомих в цій галузі, в тому числі у присутності каталізатора на основі перехідного металу (наприклад, реакція Сузукі-Міяури), у фотолітичних умовах або шляхом поодиноких реакцій перенесення електронів, у тому числі, наприклад, для комплексоутворення N-гідроксифталімідного складного ефіру з дибором у радикальному сполученні, полегшеному піридин-борним радикалом, для одержання транс-циклопропан-боронату 15 (Дивись, наприклад, W.-M. Cheng; S. Rui; B. Zhao; W.-L. Xing; Y. Fu. Org. Lett. 2017, 19, 4291-4294.). Сполучення боронату 15 з арил хлоридом 4 і подальше деметилювання для одержання хіральних сполук типу сполук Формули Ib можуть бути здійснені аналогічно описаному на Схемі 1.

Схема 4



5 Схема 4 описує синтез сполук Формули Ic. Для одержання заміщеного піридазину 19 нуклеофільне заміщення дихлорпіридазину 17 може бути здійснено в умовах генерування вільних радикалів (наприклад, реакція Мінісци), добре відомих в цій галузі. Для одержання сполук типу сполуки Формули Ic сполучення боронату 20 з арил хлоридом 19 і подальше деметилювання може бути здійснено аналогічно описаному на Схемі 1.

Схема 5



10 Схема 5 описує синтез сполук Формули Id. Для одержання метоксипіридазину 22 заміщення 2-хлорпіридазину 21 може бути здійснено в нуклеофільних умовах, загальновідомих в цій галузі. Подальше деметилювання сполуки 22 може проводитись аналогічно описаному на Схемі 1 для одержання сполук типу сполук Формули Id.

Схема 6

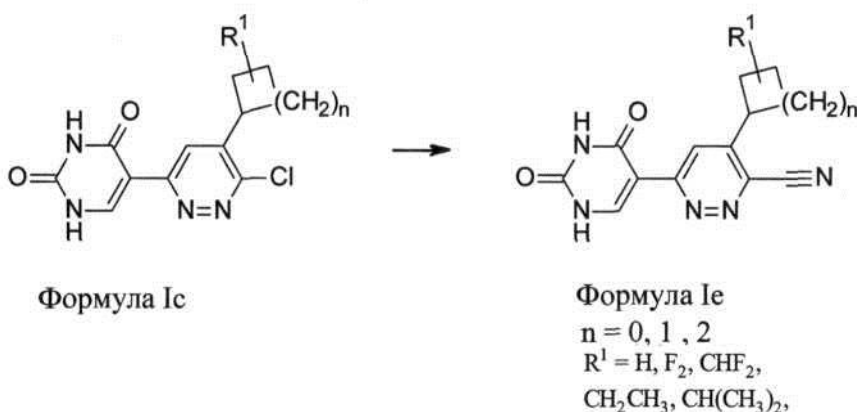
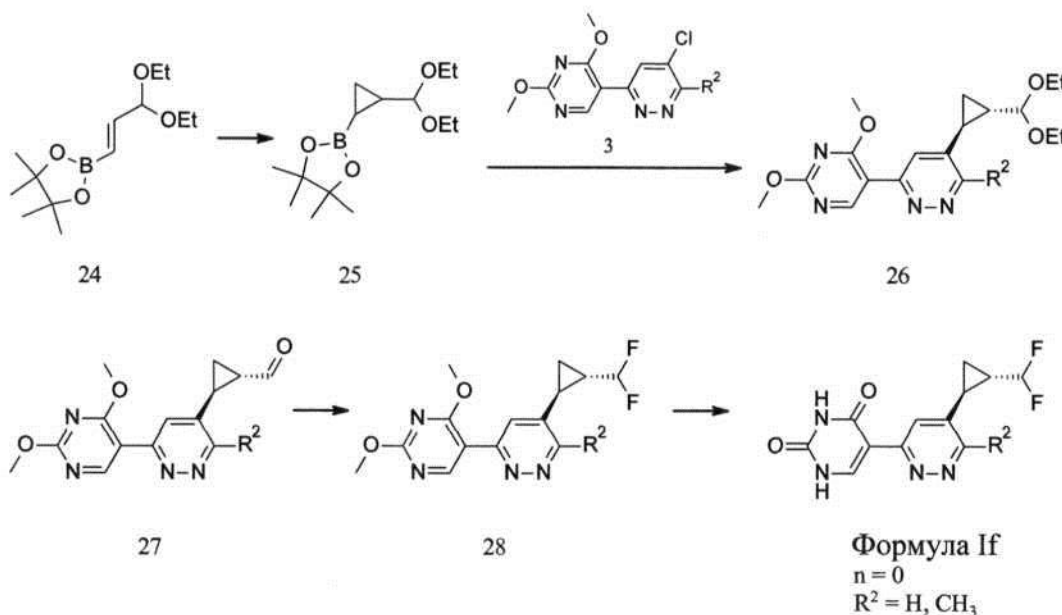


Схема 6 описує синтез сполук Формули Ie. Для одержання сполук типу сполуки Формули Ie ціанування сполуки Формули Ic може бути здійснено за різних умов, відомих у цій галузі, в тому числі реакцій, каталізованих перехідними металами (наприклад, Pd, Cu, Rh).

Схема 7



5

Схема 7 описує синтез сполук Формули If. Алкенілборонат може бути циклопропанований аналогічно описаному на Схемі 2. Для одержання хіральної сполуки 26 сполучення боронату 25 з арил хлоридом 3 може бути здійснено аналогічно описаному на Схемі 1. Зворотне перетворення діетилацеталю 26 на альдегід 27 може бути здійснено шляхом обробки відповідною кислотою. Обробка альдегіду 27 різноманітними фторуєчими реагентами (наприклад, DAST, XtalFluor®, Fluolead™ або Deoxo-Fluor®) може забезпечити одержання дифторметилу 28. Для одержання сполук типу сполуки Формули If подальше деметилування сполуки 28 може бути проведене аналогічно описаному на Схемі 1.

10

Схема 8

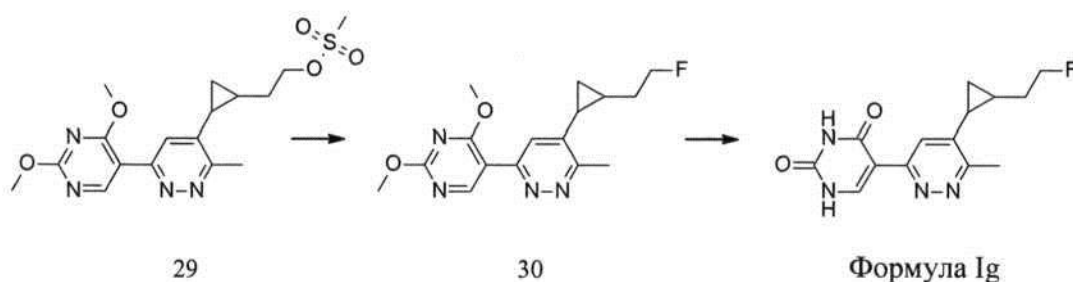


Схема 8 описує синтез сполук Формули Іg. Метансульфонат 29 може бути перетворений на фтори 30, із застосуванням відомих фахівцю методів заміщення з реагентами, такими як фторид калію або фторид трет-бутиламонію. Для одержання хіральної сполуки Формули Іg подальше деметилування може бути здійснено аналогічно описаному на Схемі 1.

#### 5 Препаративні методики та Приклади

Наведені нижче Препаративні методики та Приклади додатково ілюструють цей винахід та відображають типовий синтез сполук за цим винаходом, але не мають тлумачитись для обмеження обсягу цього винаходу у будь-який спосіб. Реагенти та вихідні матеріали є легко доступними або можуть бути легко синтезовані фахівцем у цій галузі. Слід розуміти, що

10 Препаративні методики та Приклади представлені як ілюстрації, а не обмеження, і що фахівцем у цій галузі можуть бути внесені різні модифікації.

LC-ES/MS виконують на системі рідинної хроматографії Agilent HP 1100. Мас-спектрометричні вимірювання з електророзпилюванням (одержані в позитивному та/або негативному режимі) проводяться на квадрупольному мас-спектрометрі з селективним

15 детектором маси, підключеному до системи вискоєфективної рідинної хроматографії HP1100 HPLC. Умови LC-MS (низький pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1 × 50 мм, 3,0 мкм; градієнт: 5-100 % В протягом 3 хв, потім 100 % В протягом 0,75 хв. температура колонки: 50±10 °C; швидкість потоку: 1,2 мл/хв; Розчинник А: деіонізована вода з 0,1 % HCOOH; Розчинник В: ACN з 0,1 % мурашиної кислоти; довжина хвилі 214 нм. Альтернативні умови LC-

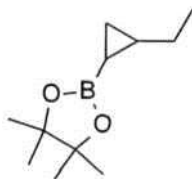
20 MS (високий рівень pH): колонка: колонки WATERS™ XTERRA® MS C-18, 2,1 × 50 мм, 3,5 мкм; градієнт: 5 % розчинника А протягом 0,25 хв., градієнт від 5 % до 100 % розчинника В протягом 3 хв. і 100 % розчинника В протягом 0,5 хв. або від 10 % до 100 % розчинника В протягом 3 хв. і при 100 % розчинника В протягом 0,75 хв.; температура колонки: 50±10 °C; швидкість потоку: 1,2 мл/хв.; Розчинник А: 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 9; Розчинник В: ACN; довжина хвилі: 214 нм.

25 Препаративну хроматографію з оберненою фазою здійснюють на системі Agilent 1200 LC-ES/MS, спорядженій мас-спектрометром з селективним детектором маси та автопробовідбірником/коллектором фракцій Leap. Методи з високим рівнем pH застосовують на колонці PHENOMENEX® GEMINI®-NX 75 × 30 мм з частинками розміром 5 мкм і передколонкою 10 × 20 мм. Швидкість потоку 85 мл/хв. Елюент: 10 mM розчин бікарбонату амонію (pH 10) в ACN.

Спектри ЯМР, які визначали на ЯМР спектрометрі Bruker AVIII HD 400 МГц, одержували з розчинів у CDCl<sub>3</sub> або (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO і представляли дані у млн.<sup>-1</sup>, із застосуванням залишкового розчинника [CDCl<sub>3</sub>, 7,26 млн.<sup>-1</sup>; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 2,50 млн.<sup>-1</sup>] як еталонного стандарту. При

35 представленні даних пікової мультиплетності можуть використовуватись такі аббревіатури: s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), m (мультиплет), br-s (широкий синглет), dd (дублет дублетів), dt (дублет триплетів). Константи взаємодії (J), коли представлені дані, надаються в герцах (Гц).

Препаративна методика 1 Рацемічний транс-2-(2-етилциклопропіл)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан



40 До розчину 2-[(E)-бут-1-еніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (1,65 г, 9,06 ммоль) в Et<sub>2</sub>O (45,30 мл) додають Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,20 г, 0,90 ммоль). Обробляють ультразвуком протягом 5 хв., і охолоджують до температури -5 °C.

У 250 мл колбу Ерленмейєра вміщують спочатку 40 % водний розчин KOH (162 мл), після чого Et<sub>2</sub>O (245 мл). Двофазну суміш охолоджують до температури -5 °C на водяній бані з сумішшю лід/насичений водний розчин NaCl. Порціями протягом 10 хв. додають N-нітрозоз-N-метилсечовину (36,1 г, 350 ммоль). Перемішують протягом 15 хвилин, і поміщають на баню з сумішшю сухий лід/ацетон. Шар діетилового ефіру зливають у вимірювальний циліндр, і до описаного вище розчину при температурі -5 °C додають суміш Et<sub>2</sub>O (71 мл, ~ 10 еквівалентів CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Через 2 год. вміст реакційної суміші фільтрують через діатомову землю, сушать над

50 MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (1,08 г, 58 %).<sup>1</sup>H ЯМР (d<sub>6</sub>-DMSO) δ: -0,51 (dt, J=9,3 Гц, 5,7 Гц, 1H), 0,33-0,37 (m, 1H), 0,50-0,54 (m, 1H), 0,76-0,84 (m, 1H), 0,91 (t, J=7,4 Гц, 3H), 1,14 (s, 12H), 1,21-1,30 (m, 2H).

Методика альтернативна Препаративній методиці 1

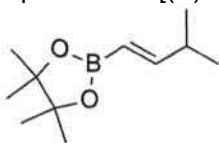
До розчину біс(пентаметилциклопентадієніл)цирконію діхлориду (11,1г, 25,5 ммоль) в THF (3,4 л) у атмосфері азоту при температурі 0 °С додають 1М розчин літію триетилборогідриду в THF (41,3 мл, 41,3 ммоль). Нагрівають до кімнатної температури, і перемішують протягом 1 год., захищаючи колбу від світла алюмінієвою фольгою.

У іншій охолодженій азотом колбі при температурі -78 °С конденсують 1-бут-1-ин (50,6 г, 936 ммоль), і додають пінаколборан (55,0 г, 425 ммоль). Одержану суміш перемішують при температурі -78 °С протягом 30 хвилин, і через канюлю додають вміст першої колби. Додають TEA (5,93 мл, 42,6 ммоль), і реакційну суміш перемішують і одночасно нагрівають до кімнатної температури протягом 20 год. Реакцію гасять додаванням через канюлю суміші лід/вода (1,5 л), додають EtOAc (300 мл), і перемішують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Одержані шари відокремлюють, і водну фазу повторно екстрагують EtOAc (2 × 200 мл). Органічні екстракти об'єднують, сушать над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фільтрують, і концентрують in vacuo до одержання 2-[(E)-бут-1-еніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (53 г, 65 %) у вигляді масла жовтого кольору.

GC-MS(m/z): 182 (M+).

До хлорйодометану (55 мл, 755 ммоль) при температурі -20 °С протягом 10 хв. додають розчин діетилцинку в толуолі (15 % (мас.), 550 мл, 611 ммоль), і перемішують протягом 35 хв. Краплями протягом 20 хв. додають розчин 2-[(E)-бут-1-еніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (53 г, 277 ммоль) в толуолі (100 мл), підтримуючи внутрішню температуру реакційної суміші на рівні -20 °С. Суміш перемішують протягом 2 год. з одночасним нагріванням до температури 0 °С. Реакцію гасять шляхом повільного додавання насиченого водного розчину NH<sub>4</sub>Cl (750 мл). Органічний шар відокремлюють, і водну фазу повторно екстрагують EtOAc (2 × 250 мл). Органічні екстракти об'єднують, сушать над MgSO<sub>4</sub>, фільтрують, і випарюють до одержання вказаної в заголовку сполуки (48 г, 84 %) у вигляді масла, придатного для застосування без додаткового очищення. GC-MS(m/z): 180(M-16).

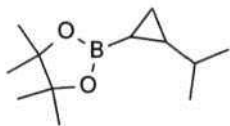
Препаративна методика 2 4,4,5,5-Тетраметил-2-[(E)-3-метилбут-1-еніл]-1,3,2-діоксаборолан



Пінаколборан (9,5 мл, 64 ммоль) краплями протягом 5 хв. додають до льодяного 3-метилбут-1-ину (4,91 г, 72,0 ммоль). Реакційну посудину високого тиску герметизують, нагрівають до кімнатної температури, і вміст перемішують протягом 18 год. Додають біс(циклопентадієніл)цирконію(IV) хлоргідрид (2,0 г, 7,4 ммоль) та TEA (1,1 мл, 7,9 ммоль). Реакційну посудину високого тиску герметизують, поміщають на масляну баню при температурі 60 °С, і перемішують протягом 10 хв. Одержаний розчин червоного кольору протягом 2,5 год. охолоджують до кімнатної температури. Реакційну суміш розбавляють DCM (200 мл), промивають насиченим водним розчином NaHCO<sub>3</sub> (100 мл), насиченим водним розчином NaCl (50 мл), сушать над MgSO<sub>4</sub>, фільтрують через шар силікагелю (150 мл), силікагель промивають DCM (700 мл), і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (11,5 г, 82 %). ES/MS (m/z): 196 (M+H). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,03 (d, J=6,7 Гц, 6H), 1,29 (s, 12H), 2,37 (m, 1H), 5,40 (dd, 1H), 6,64 (dd, 1H).

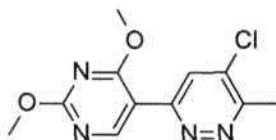
Препаративна методика 3

Рацемічний транс-2-[2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан



До льодяної двофазної суміші Et<sub>2</sub>O (70 мл) та водного розчину KOH (30,5 г, 435 ммоль, 70 мл H<sub>2</sub>O) порціями додають N-нітрозно-N-метилсечовину. Перемішують до розчинення твердих речовин (<5 хв.). Одержаний розчин діазометану піпеткою вносять в ретельно перемішувану льодяну суспензію Pd(OAc)<sub>2</sub> (237 мг, 1,05 ммоль) та 4,4,5,5-тетраметил-2-[(E)-3-метилбут-1-еніл]-1,3,2-діоксаборолану (4,00 г, 20,4 ммоль) в Et<sub>2</sub>O (70 мл). Після завершення додавання реакційну суміш нагрівають до кімнатної температури, фільтрують через діатомову землю, і фільтрат концентрують in vacuo. Одержаний залишок розчиняють в DCM, фільтрують через шар силікагелю (25 г), і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (4,32 г, >99 %). ES/MS (m/z): 210 (M+H). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: -0,35 (m, 1H), 0,45 (m, 1H), 0,65 (m, 1H), 0,78 (m, 1H), 0,98 (m, 7H), 1,23 (s, 12H).

Препаративна методика 4 4-Хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин



У посудині високого тиску у суміші (1:4) діоксан/H<sub>2</sub>O (151 мл) об'єднують 2,4-диметокси-5-піримідинілборонову кислоту (6,75 г, 36,7 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпіридазин (5,98 г, 36,7 ммоль), [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій(II) (0,55 г, 0,73 ммоль) та CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (29,9 г, 91,8 ммоль). Повітря видаляють, і посудину заповнюють N<sub>2</sub>. Посудину герметизують, і гріють при температурі 70 °C протягом 3 год. Залишок фільтрують через діатомову землю, і промивають EtOAc. Органічну суміш промивають спочатку водою, потім насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, і випарюють насухо. Одержаний залишок чорного кольору очищають шляхом хроматографування на силікагелі, із застосуванням 330 г колонки REDISEP® з градієнтом 0-30 % DCM/(33 % MeOH у DCM) протягом 15 хв. при швидкості потоку 200 мл/хв., і одержують вказану в заголовку сполуку (6,2 г, 63 %) після випаровування хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z) (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 267/269 [M+1]<sup>+</sup> Н ЯМР (d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 2,74 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 4,03 (s, 3H), 8,20 (s, 1H), 8,87 (s, 1H).

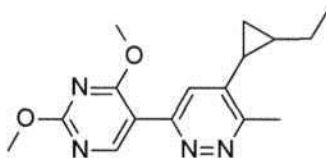
Методика альтернативна Препаративній методиці 4

Потік азоту протягом 5 хв. пропускають через суміш (2,4-диметоксипіримідин-5-іл)боронової кислоти (85 г, 439 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпіридазину (75 г, 437 ммоль) та Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 г, 1099 ммоль) в 1,4-діоксані (1175 мл) і H<sub>2</sub>O (340 мл). Додають [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій(II) (6,6 г, 8,7 ммоль), і перемішують одержану суміш при температурі 75 °C протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, фільтрують суміш через діатомову землю, і відфільтрований осад промивають EtOAc. Одержані шари відокремлюють, органічну фазу двічі промивають насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, фільтрують, і концентрують in vacuo. До одержаного залишку додають воду (500 мл), перемішують протягом 16 год. при кімнатній температурі, і відфільтровують одержану тверду речовину. Зібрану тверду речовину промивають H<sub>2</sub>O, сушать у вакуумі протягом 16 год., і одержують бажану сполуку (70 г, 54 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору. ES/MS (m/z) (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 267/269 [M+1]<sup>+</sup>.

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано у Препаративній методиці 4.

Препаративна методика №	Хімічна назва	Хімічна структура	ES/MS (m/z) ( <sup>35</sup> Cl/ <sup>37</sup> Cl)
5	5-(5-Хлорпіридазин-3-іл)-2,4-диметоксипіримідин		253/255

Препаративна методика 6 тмранс-5-[2-Етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин



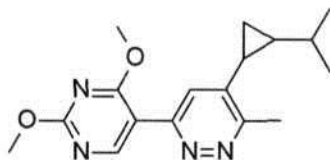
У 20 мл реакційну посудину високого тиску вміщують 4-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин (0,6 г, 2,0 ммоль), біс(ди-трет-бутил(4-диметиламінофеніл))фосфін)дихлорпаладій(II) (114мг, 0,16 ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,69 г, 4,9 ммоль), H<sub>2</sub>O (2,25 мл) та рацемічний транс-2-[2-етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan (0,66 г, 3,37 ммоль). З посудини видаляють повітря, і заповнюють N<sub>2</sub>. Посудину герметизують, і гріють при температурі 90 °C протягом ночі. Реакційну суміш фільтрують через діатомову землю, органічний шар спочатку промивають водою, потім насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo. Одержаний залишок очищають методом хроматографії з оберненою фазою, із застосуванням 275 г колонки REDISEP® Gold C18, елюючи градієнтом 30-50 % 10 мМ розчину NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/ACN протягом 20 хв. при швидкості потоку 150 мл/хв., і одержують вказану в заголовку сполуку, що являє собою по суті рацемічну

суміш ізомерів (475 мг, 70 %), у вигляді твердої речовини білого кольору після випаровування хроматографічних фракцій.

Одержані ізомери піддають очищенню із застосуванням SFC (колонка: PHENOMENEX® LUX® Cellulose-4, 4,6 × 150 мм; 40 % MeOH/CO<sub>2</sub>, ізократичне елюювання; швидкість потоку: 5 мл/хв., УФ 250 нм), і одержують 0,197 г ізомеру 1: tR=2,71 хв. (УФ); і 0,195 г ізомеру 2: tR 3,55 хв. (УФ), обидва з >98 % ee. ES/MS (m/z): 301 (M+H).

Препаративна методика 7

транс-5-[2-Ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин

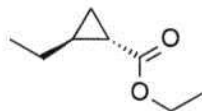


Об'єднують 4-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин (1,97 г, 7,39 ммоль), рацемічний транс-2-[2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан (3,32 г, 15,8 ммоль), біс(ди-трет-бутил(4-диметиламінофеніл)фосфін)дихлорпаладій(II) (1,35 г, 1,85 ммоль), 1,4-діоксан (37 мл), і 1М водний розчин Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18 мл, 18 ммоль). Реакційну посудину продувають N<sub>2</sub>, і нагрівають до температури 90 °C протягом 18 год. Охолоджують до кімнатної температури, розбавляють EtOAc (150 мл), і шари розділяють. Органічний шар послідовно промивають 1М водним розчином Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, фільтрують, і фільтрат концентрують in vacuo. Одержаний залишок очищають шляхом хроматографування на діоксиді кремнію, елюючи градієнтом 60-100 % EtOAc/DCM, і одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді по суті рацемічної суміші ізомерів (1,48 г, 64 %) після випаровування хроматографічних фракцій.

Одержані ізомери піддають очищенню із застосуванням SFC (колонка: PHENOMENEX® LUX® Cellulose-4, 4,6 × 150 мм; 40 % MeOH/CO<sub>2</sub>, ізократичне елюювання; швидкість потоку: 5 мл/хв., УФ 250 нм), і одержують 647 мг ізомеру 1: tR=2,56 хв., і 647 мг ізомеру 2: tR=3,75 хв. ES/MS (m/z): 315 (M+H).

Препаративна методика 8

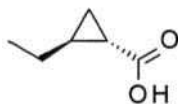
Етил-(18,28)-2-етилциклопропанкарбоксилат



До розчину етил-2-діетоксифосфорилацетату (62,2 г, 277 ммоль) в 1,4-діоксані (400 мл), охолоджену на льодо-водяній бані (внутрішня температура: 8 °C), краплями протягом 10 хвилин додають 2,5 М розчин n-BuLi в гексанах (110 мл, 280 ммоль). Видаляють охолоджувальну ванну, і перемішують протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Розчин за допомогою канюлі переносять в 1 л реакційну посудину високого тиску, і додають (2R)-2-етилоксиран (20 г, 280 ммоль). Одержану суміш перемішують при температурі 150 °C (тиск 50 фунтів/кв.дюйм (0,3447 МПа)) протягом 17 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, і додають воду (250 мл). Органічну фазу відокремлюють, і водну фазу повторно екстрагують MTBE (2 × 200 мл). Органічні екстракти об'єднують, промивають насиченим водним розчином NaCl (2 × 150 мл), сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку неочищеної сполуки (49,1 г, кількісний вихід) у вигляді масла жовтого кольору, придатного для застосування без додаткового очищення. GC-MS (m/z): 142 (M+), 97 (M-45).

Препаративна методика 9

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

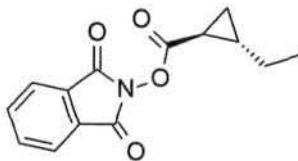


Суміш етил-(1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбоксилату (39,44 г, 277,4 ммоль), 1,4-діоксану (315 мл) і 25 % водного розчину гідроксиду натрію (315 мл) перемішують при температурі 100 °C протягом 16 год. Суміш охолоджують до кімнатної температури, екстрагують MTBE (2 × 300 мл), і видаляють органічну фазу. Водну фазу підкислюють 37 % водним розчином HCl до pH~1-2, екстрагують MTBE (3 × 300 мл), шари розділяють, органічний шар промивають насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (25,1 г, 75 %) у вигляді олії бурштинового кольору. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,79-

0,85 (m, 1H), 1,00 (t, J=7,5 Гц, 3H), 1,22-1,26 (m, 1H), 1,32-1,42 (m, 3H), 1,43-1,48 (m, 1H), 9,0-12,0 (br-s, 1H).

Препаративна методика 10

(1,3-Діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбоксилат



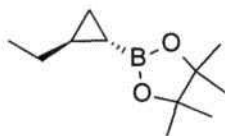
5

Суспензію (1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбонової кислоти (25,1г, 209 ммоль), 2-гідроксиізоіндолін-1,3-діону (34,8 г, 209 ммоль) і DMAP (2,58 г, 20,9 ммоль) перемішують у DCM (360 мл) при температурі 0 °С і краплями додають N, N'-діізопропілкарбодіїмід (29,3 г, 230 ммоль). Охолоджувальну ванну видаляють, і реакційну суміш перемішують протягом 2 год. при кімнатній температурі. Суспензію фільтрують через силікагелеву пробку, елюючи DCM. Розчинник випарюють, і одержаний залишок очищають шляхом хроматографування на силікагелі, елюючи сумішшю 15 % гексану/ацетон, і одержують вказану в заголовку сполуку (51,56 г, 84 %) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): 260 (M+1).

10

Препаративна методика 11

2-[(1S, 2S)-2-Етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан

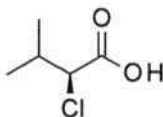


Потік N<sub>2</sub> протягом 5 хв. пропускають через розчин (1,3-діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2S)-2-етилциклопропанкарбоксилату (51 г, 173,1 ммоль) та біс(пінаcolato)дибору (87,9 г, 346 ммоль) у EtOAc (1 л). Додають етилізонікотинат (5,34 г, 35 ммоль), і перемішують суміш при температурі 85 °С протягом 24 год. Одержану суспензію охолоджують, фільтрують, тверду речовину відкидають, і фільтрат коричневого кольору концентрують при зниженому тиску. Одержаний неочищений залишок фільтрують через силікагелеву пробку, елюючи сумішшю 2 % EtOAc/гексани. Видаляють розчинник з фільтрату, і одержаний залишок піддають повторному очищенню шляхом хроматографування на силікагелі, елюючи 3 % EtOAc/гексани, і одержують вказану в заголовку сполуку (17,1 г, 49 %) у вигляді безбарвного масла після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. GC-MS (m/z): 180 (M-16).

25

Препаративна методика 12

(2S)-2-Хлор-3-метилбутанова кислота



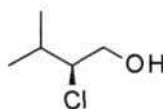
30

Розчин L-валіну (286 г, 2,44 моль) і 5М водний розчин HCl (3,25 л, 16,3 моль) охолоджують при температурі 0 °С. Краплями протягом 2 годин додають 4М водний розчин NaNO<sub>2</sub> (1 л, 4 моль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 5 °С. Реакційну суміш перемішують протягом 2 год. з одночасним нагріванням до кімнатної температури, і додатково перемішують ще протягом 16 год. при кімнатній температурі. Протягом 30 хв. порціями додають Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 г, 2,28 моль). Одержаний розчин екстрагують MTBE (3 × 1000 мл), об'єднані органічні екстракти промивають насиченим водним розчином NaCl (500 мл), органічні екстракти сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo. Одержаний залишок очищають вакуумною перегонкою (15 мбар/140 °С (1500 Па/140 °С)), і одержують вказану в заголовку сполуку (248 г, 68 %) у вигляді масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,1 (dt, J=6,6 Гц, 2,6 Гц, 6H), 2,34-2,42 (m, 1H), 4,19-4,23 (m, 1H), 10,0-12,0 (br-s, 1H).

40

Препаративна методика 13

(2S)-2-Хлор-3-метилбутан-1-ол



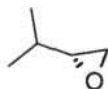
45

Розчин (2S)-2-хлор-3-метилбутанової кислоти (137 г, 1 моль) у 2-метилтетрагідрофурані (500 мл) охолоджують до температури 0 °С. Краплями протягом 2,5 годин додають 2,3М розчин



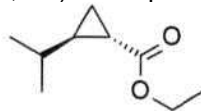
ЛАН у метилтетрагідрофурані (480 мл, 1,1 моль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 10 °С. Нагрівають до кімнатної температури, і суміш перемішують протягом 1 год. при кімнатній температурі і протягом 1 год. при температурі 50 °С. Реакційну суміш охолоджують до температури 0 °С, і послідовно та повільно додають H<sub>2</sub>O (1,48 мл), 15 % водний розчин NaOH (1,48 мл) і H<sub>2</sub>O (4,46 мл). Реакційній суміші дозволяють нагрітися до кімнатної температури, фільтрують через шар діатомової землі, і випарюють розчинник in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (110 г, 81 %) у вигляді безбарвного масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,97-1,1 (m, 6H), 1,94-2,18 (m, 1H), 2,60-3,09 (br-s, 1H), 3,71-3,78 (m, 1H), 3,80-3,85 (m, 1H), 3,90-3,96 (m, 1H).

Препаративна методика 14  
(2R)-2-Ізопропілоксиран



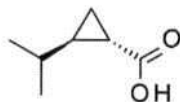
Розчин KOH (195 г, 3,48 моль) у H<sub>2</sub>O (195 мл) охолоджують до температури 0 °С, і протягом 20 хв. додають нерозбавлений (2S)-2-хлор-3-метилбутан-1-ол (110 г, 801 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 5 °С. Реакційній суміші дозволяють нагрітися до кімнатної температури. Реакційну суміш очищають шляхом вакуумної перегонки при 100 мбар (0,01 МПа), нагріваючи від температури 23 °С до 50 °С, і одержують вказану в заголовку сполуку (47 г, 64 %) у вигляді безбарвного масла, <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,98 (d, J=6,9 Гц, 3H), 1,05 (d, J=6,9 Гц, 3H), 1,51 (o, J=6,9 Гц, 1H), 2,52-2,54 (m, 1H), 2,70-2,75 (m, 2H).

Препаративна методика 15 Етил-(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилат



До розчину етил-2-діетоксифосфорилацетату (153 мл, 772 ммоль) в 1,4-діоксані (870 мл), охолоджену на льодо-водяній бані (внутрішня температура: 8 °С), краплями протягом 25 хв. додають 2,5М розчин n-BuLi в гексанах (310 мл, 780 ммоль). Нагрівають до кімнатної температури, і перемішують протягом 40 хв. Розчин за допомогою канюлі переносять в 3 л реакційну посудину високого тиску, і додають (2R)-2-ізопропілоксиран (70 г, 772 ммоль) в 1,4-діоксані (180 мл). Реакційну суміш перемішують при температурі 150 °С під тиском 50 фунтів/кв. дюйм (0,3447 МПа) протягом 14 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, і додають H<sub>2</sub>O (700 мл). Шари розділяють, і водну фазу повторно екстрагують MTBE (2 × 500 мл). Органічні фази об'єднують, промивають насиченим водним розчином NaCl (2 × 350 мл), сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку неочищеної сполуки (107,7 г, >99 %) у вигляді масла жовтого кольору, придатного для подальшого застосування без додаткового очищення. GC-MS (m/z): 156 (M<sup>+</sup>).

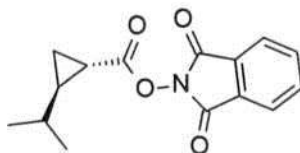
Препаративна методика 16  
(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбонова кислота



Суміш етил-(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилату (107,7 г, 482,6 ммоль) у 1,4-діоксані (800 мл), що містить 25 % водний розчин NaOH (800 мл), перемішують при температурі 100 °С протягом 7 год. Суміш охолоджують до кімнатної температури, додають воду (300 мл), екстрагують MTBE (2 × 500 мл), і видаляють органічну фазу. Водну фазу підкисляють 37 % водним розчином HCl (приблизно 500 мл) до pH 1-2.

Підкислену водну суміш екстрагують MTBE (2 × 600 мл), органічний шар промивають насиченим водним розчином NaCl, сушать над MgSO<sub>4</sub>, і концентрують in vacuo до одержання вказаної в заголовку сполуки (54,2 г, 75 %) у вигляді масла бурштинового кольору. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,81-0,86 (m, 1H), 1,01 (dd, J=5,9 Гц, 3,7 Гц, 6H), 1,04-1,13 (m, 1H), 1,20-1,24 (m, 1H), 1,28-1,37 (m, 1H), 1,39-1,44 (m, 1H).

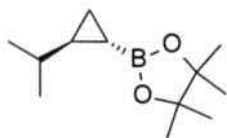
Препаративна методика 17  
(1,3-Діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилат



Суспензію (1S, 2R)-2-ізопропілциклопропанкарбонової кислоти (54,2 г, 359 ммоль), 2-гідроксиізоіндолін-1,3-діону (59,8 г, 359 ммоль) і DMAP (4,44 г, 35,9 ммоль) перемішують у DCM (690 мл) при температурі 0 °С. Краплями додають N, N'-діізопропілкарбодіїмід (50,4 г, 395 ммоль), нагрівають до кімнатної температури, і одержану реакційну суміш перемішують протягом 2 год. при кімнатній температурі. Додають H<sub>2</sub>O (600 мл), і фази розділяють. Водну фазу екстрагують DCM (2 × 300 мл), органічні фази об'єднують, сушать над MgSO<sub>4</sub>, фільтрують, і випарюють. Одержаний твердий залишок очищають шляхом хроматографування на діоксиді кремнію, елюючи 100 % DCM, і одержують вказану в заголовку сполуку (96 г, 88 %) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору після випаровування хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): 274 (M+1).

Препаративна методика 18

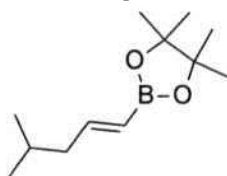
2-[(1S, 2S)-2-Ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан



Потік азоту протягом 15 хв. пропускають через розчин (1,3-діоксоізоіндолін-2-іл)-(1S, 2S)-2-ізопропілциклопропанкарбоксилату (96 г, 316 ммоль) та біс(пінаcolato)дибору (160 г, 630 ммоль) у EtOAs (480 мл). Суміш перемішують при температурі 85 °С, і краплями протягом 10 хв. додають етилізонікотинат (24,38 г, 157 ммоль). Одержану суміш перемішують при температурі 85 °С протягом 16 год. Одержану суспензію охолоджують, фільтрують, тверду речовину видаляють, і фільтрат коричневого кольору випарюють при зниженому тиску. Неочищений залишок фільтрують через силікагелеву пробку, елюючи сумішшю 2 % EtOAs/гексани. Видаляють розчинник з фільтрату, і одержаний залишок піддають повторному очищенню шляхом хроматографування на силікагелі, елюючи сумішшю 3 % EtOAs/гексани, і одержують вказану в заголовку сполуку (25,3 г, 38 %) у вигляді безбарвного масла після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): -0,33-0,38 (m, 1H), 0,42-0,47 (m, 1H), 0,63-0,67 (m, 1H), 0,75-0,82 (m, 1H), 0,89-1,02 (m, 1H), 0,98 (m, 6H), 1,24 (s, 12H).

Препаративна методика 19

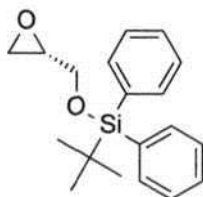
4,4,5,5-Тетраметил-2-[(E)-4-метилпент-1-еніл]-1,3,2-діоксаборолан



[(E)-4-метилпент-1-еніл]боронову кислоту (0,975 г, 7,62 ммоль) та пінакол (1,11 г, 9,14 ммоль) розчиняють у безводному DCM (9,7 мл). Додають MgSO<sub>4</sub> (0,7313 г, 6,05 ммоль), і перемішують при кімнатній температурі протягом 3 днів. Нерозчинні тверді речовини відфільтровують, і розчинник видаляють при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді прозорого масла (1,6 г, 100 %). <sup>1</sup>H ЯМР (400,13 МГц, DMSO): 0,86 (d, J=6,6 Гц, 6H), 1,08 (s, 6H), 1,19 (s, 12H), 1,62-1,72 (m, 1H), 2,01 (td, J=6,9 Гц, 1,4 Гц, 2H), 3,92 (s, 1H), 5,31 (dt, τ=17,9 Гц, 1,3 Гц, 1H), 6,47 (dt, J=17,9 Гц, 6,9 Гц, 1H).

Препаративна методика 20

трет-Бутил-[[[(2S)-оксиран-2-іл]метокси]-дифенілсилан

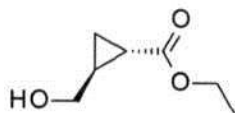


До льодяного розчину [(2R)-оксиран-2-іл]метанолу (15,0 г, 202,6 ммоль) в DMF (135 мл) додають імідазол (33,34 г, 489,8 ммоль), і перемішують протягом 15 хв. Краплями протягом 30

хв додають трет-бутил-хлордифенілсилан (77 мл, 302,5 ммоль), і перемішують протягом ночі при кімнатній температурі. Розбавляють гексанами (1 л), діетиловим ефіром (500 мл) і водою (1 л). Шари розділяють, і водний шар екстрагують діетиловим ефіром (2 × 1 л). Органічні шари об'єднують, і промивають водою (3 × 750 мл), насиченим розчином  $\text{NaHCO}_3$ , насиченим водним розчином  $\text{NaCl}$ , і сушать над  $\text{MgSO}_4$ . Розчинник випарюють при зниженому тиску. Очищають шляхом хроматографування на силікагелі, елюент: 0-10 %  $\text{EtOAc}$  у гексанах, і одержують вказану в заголовку сполуку (11,77 г, 18 %) у вигляді масла після видалення розчинника з хроматографічної фракції.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,08 (s, 9H), 2,64 (dd,  $J=2,6$  Гц, 5,1 Гц, 1H), 2,77 (t,  $J=4,6$  Гц, 1H), 3,15 (quintet,  $J=3,5$  Гц, 1H), 3,73 (dd,  $J=4,7$  Гц, 11,8 Гц, 1H), 3,88 (dd,  $J=3,2$  Гц, 11,9 Гц, 1H), 7,40-7,48 (m, 6H), 7,71 (m, 4H).

Препаративна методика 21

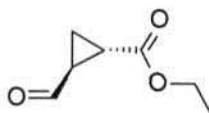
Етил (1S, 2S)-2-(гідроксиметил)циклопропанкарбоксилат



До суспензії трет-бутоксида натрію (3,67 г, 37,82 ммоль) у 1,4-діоксані (40 мл) при кімнатній температурі повільно додають триетилфосфоноацетат (7,5 мл, 38 ммоль). Через 1 год. додають трет-бутил-[[2S)-оксиран-2-іл]метокси]-дифенілсилан (11,77 г, 33,76 ммоль), і гріють при температурі 140 °C протягом ночі в герметичній реакційній посудині високого тиску. Додають додаткову кількість триетилфосфоноацетату (2 мл), і гріють при температурі 160 °C протягом години. Суміші дозволяють охолонути, і розбавляють DCM (300 мл) і водою (150 мл). Шари розділяють, водний шар екстрагують DCM (3 × 150 мл). Органічні шари об'єднують, і промивають насиченим водним розчином  $\text{NaHCO}_3$ , насиченим водним розчином  $\text{NaCl}$ , і сушать над  $\text{MgSO}_4$ . Фільтрують через діатомову землю, і розчинник випарюють при зниженому тиску до одержання етил-(1S, 2S)-2-[[трет-бутил(дифеніл)силіл]оксиметил]циклопропанкарбоксилату (18,45 г) у вигляді масла. Розчиняють у THF (75 мл), і при кімнатній температурі додають тетрабутиламонію фторид (1M THF, 67 мл, 67 ммоль, 1,0 M). Перемішують протягом 48 год., і видаляють розчинник при 130 мбар (0,013 МПа) і температурі 30 °C. Очищають шляхом хроматографування на силікагелі, елюент: 0-50 %  $\text{EtOAs}$  у гексанах, і виділяють вказану в заголовку сполуку (3,35 г, 62 %) у вигляді масла після видалення розчинника з хроматографічної фракції. ES/MS ( $m/z$ ): 142 ( $M+1$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,90-0,86 (m, 1H), 1,23 (dd,  $J=4,5$  Гц, 8,9 Гц, 1H), 1,28 (t,  $J=7,2$  Гц, 4H), 1,56-1,60 (m, 1H), 1,69-1,77 (m, 2H), 2,06 (s, 2H), 3,50 (dd,  $J=6,9$  Гц, 11,5 Гц, 1H), 3,64 (dd,  $J=6,0$  Гц, 11,4 Гц, 1H), 4,14 (qd,  $J=7,1$  Гц, 2,9 Гц, 3H).

Препаративна методика 22

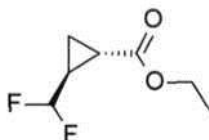
Етил-(1S, 2S)-2-формілциклопропанкарбоксилат



До охолодженого льодом розчину етил-(1S, 2S)-2-(гідроксиметил)циклопропанкарбоксилату (12,25 г, 84,9 ммоль) у DCM (425 мл) однією порцією додають піридинію хлорхромат (26,09 г, 118,6 ммоль). Через 30 хв. баню з льодом видаляють, і перемішують при кімнатній температурі протягом 4 год. Додають воду (200 мл), і фільтрують через діатомову землю. Промивають додатковою кількістю води (100 мл) і DCM (800 мл). Відфільтрований осад в діатомовій землі суспендують в DCM, і фільтрують. Цю операцію повторюють двічі. Органічні шари об'єднують, водний шар відокремлюють, і органічний шар фільтрують через шар діоксиду кремнію. Промивають додатковою кількістю DCM, і розчинник випарюють при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (11,0 г, 91 %) у вигляді масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,30 (t,  $J=7,3$  Гц, 3H), 1,57-1,50 (m, 1H), 1,60-1,65 (m, 2H), 2,26-2,30 (m, 1H), 2,45 (td,  $J=9,0$  Гц, 4,2 Гц, 1H), 4,13-4,22 (m, 3H), 9,32 (d,  $J=4,2$  Гц, 1H).

Препаративна методика 23

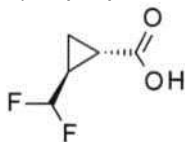
Етил-(1S, 2S)-2-(дифторметил)циклопропанкарбоксилат



Трифторид діетиламіносурфору (24 мл, 172,3 ммоль) протягом 3 хв. додають до льодяного розчину етил-(1S, 2S)-2-формілциклопропанкарбоксилату (11,00 г, 77,38 ммоль) у DCM (220 мл). Через 1 год. льодяну баню видаляють, і перемішують при кімнатній температурі протягом 2 год. Додають трифторид діетиламіносурфору (3,5 мл), і додатково перемішують протягом 1 год. Суміш охолоджують на льодяній бані, і обережно виливають в насичений водний розчин  $\text{NaHCO}_3$ . Шари розділяють, і водний шар екстрагують DCM (2 × 50 мл).

Органічні шари об'єднують, і сушать над  $\text{MgSO}_4$ . Зразок фільтрують через невеликий шар діоксиду кремнію, і розчинник випарюють при зниженому тиску (250 мбар (0,025 МПа) і 30 °C) до одержання вказаної в заголовку сполуки (11,10 г, 87 %) у вигляді масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,14-1,19 (m, 1H), 1,29 (m, 1H), 1,30 (t, J=7,2 Гц, 3H), 1,97-1,89 (m, 2H), 4,22 (q, J=7,2 Гц, 3H), 5,79 (td, JH-F=56,8 Гц, J=3,6 Гц, 1H).

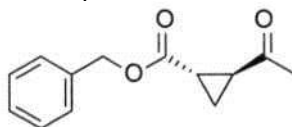
Препаративна методика 24 (1S, 2S)-2-(Дифторметил)циклопропанкарбонова кислота



До розчину етил-(1S, 2S)-2-(дифторметил)циклопропанкарбоксилату (11,10 г, 67,62 ммоль) у MeOH (75 мл) додають 1n NaOH (75 мл), і перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Додають DCM (70 мл), і шари розділяють. Водний шар екстрагують DCM (70 мл). Водний шар охолоджують на льодяній бані, і рН доводять до 1, додаючи 35 % HCl. Додають DCM (50 мл), і розділяють два шари. Водний шар екстрагують DCM. Органічні шари об'єднують, сушать над  $\text{MgSO}_4$ , і розчинник випарюють при зниженому тиску (200 мбар (0,020 МПа), 30 °C) до одержання вказаної в заголовку сполуки (6,25 г, 68 %) у вигляді масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,26 (dt, J=8,4 Гц, 5,9 Гц, 1H), 1,34-1,39 (m, 1H), 1,92-1,96 (m, 1H), 2,01-2,07 (m, 1H), 5,82 (td, JH-F=59 Гц, J=3,2 Гц, 1H).

Препаративна методика 25

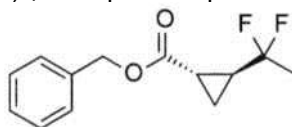
транс-Бензил-2-ацетилциклопропанкарбоксилат



До суміші бензилбромацетату (40 г, 174,618 ммоль), метилвінілкетону (43 мл, 523,85 ммоль), 1,4-діазабіцикло[2,2,2]октану (2,3 г, 20,9 ммоль) в ацетонітрилі (400 мл) додають  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (36,2 г, 261,93 ммоль). Перемішують у атмосфері  $\text{N}_2$  при температурі 80 °C протягом ночі. Дозволяють охолонути, фільтрують, і випарюють розчинник при зниженому тиску. Очищують хроматографуванням на силікагелі, елюент: 0-50 % EtOAc/гексан, і одержують вказану в заголовку сполуку (13,4 г, 35 %) після видалення розчинника з хроматографічних фракцій.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $d_6$ -DMSO): 1,33-1,39 (m, 2H), 2,08-2,13 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,54-2,59 (m, 2H), 5,13 (s, 2H), 7,39-7,37 (m, 6H).

Препаративна методика 26

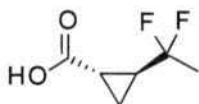
транс-Бензил-2-(1,1-дифторетил)циклопропанкарбоксилат



До суміші транс-бензил-2-ацетилциклопропанкарбоксилату (2,76 г, 12,6 ммоль) та трифториду біс(2-метоксіетил)аміносурфору (23,2 мл, 126 ммоль) при температурі 0 °C додають EtOH (0,05 екв.). Дозволяють нагрітися до кімнатної температури, і гріють при температурі 50 °C протягом 40 год. Розбавляють DCM, і охолоджують суміш на льодяній бані для повільного додавання насиченого водного розчину  $\text{NaHCO}_3$ . Шари розділяють, і водний шар екстрагують DCM (2 × 100 мл). Органічні шари об'єднують, і сушать над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Розчинник випарюють при зниженому тиску. Очищують хроматографуванням на силікагелі, елюент: 10 % MTBE/гексан, і одержують вказану в заголовку сполуку (2,30 г, 76 %) у вигляді безбарвного масла після видалення розчинника з хроматографічних фракцій.  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $d_6$ -DMSO): 1,19 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,67 (t, JH-F=16 Гц, 3H), 1,93-1,98 (m, 1H), 2,00-2,08 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 7,38-7,40 (m, 5H).

Препаративна методика 27

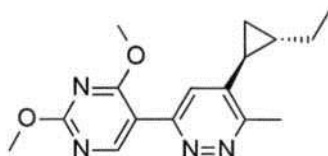
транс-2-(1,1-Дифторетил)циклопропанкарбонова кислота



До розчину транс-бензил-2-(1,1-Дифторетил)циклопропанкарбоксилату (6,56 г, 27,3 ммоль) в EtOAs (136 мл, 0,2M) додають 10 % Pd/C (1,53 г, 14,4 ммоль). Протягом 3 год. перемішують при кімнатній температурі в атмосфері  $H_2$ , застосовуючи еластичну камеру з газом під тиском. Фільтрують через діатомову землю, і промивають EtOAs. Розчинник випарюють при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (4,03 г, 98 %) у вигляді безбарвного масла.  $^1H$  ЯМР (400,13 МГц,  $d_6$ -DMSO): 1,10 (t,  $J=7,4$  Гц, 2H), 1,66 (t,  $J$  H-F=18,4 Гц, 3H), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,96-1,99 (m, 1H), 12,49 (s, 1H).

Препаративна методика 28

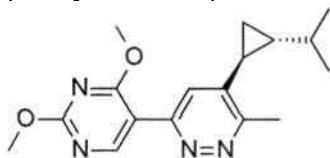
5-[5-[(1S, 2S)-2-Етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин



Суміш 4-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазину (16 г, 54,0 ммоль), 2-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (17 г, 83,22 ммоль), 2M водного розчину  $Na_2CO_3$  (70 мл, 140 ммоль) і 1,4-діоксану (290 мл) знегажують барботуванням через суміш  $N_2$  протягом 10 хв. Додають біс(ди-трет-бутил(4-диметиламінофеніл)фосфін)дихлорпаладій(II) (2,0 г, 2,74 ммоль), і одержану суміш перемішують при температурі 90 °C протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, розбавляють  $H_2O$ , і екстрагують EtOAs. Одержані фази розділяють, органічну фазу сушать над безводним  $MgSO_4$ , і концентрують in vacuo. Одержаний залишок очищують шляхом хроматографування на діоксиді кремнію, елюючи градієнтом 60-100 % гексанів/EtOAs, і одержують вказану в заголовку сполуку (12,95 г, 77 %) у вигляді масла бурштинового кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. Масло твердне при стоянні при кімнатній температурі до твердої речовини не зовсім білого кольору. ES/MS (m/z): 301 (M+1).

Препаративна методика 29

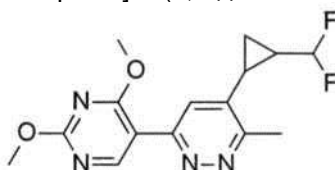
5-[5-[(1S, 2R)-2-Ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин



4-Хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин (19,1 г, 70,6 ммоль),  $K_3PO_4$  (45,9 г, 212 ммоль), 1,4-діоксан (300 мл) і  $H_2O$  (75 мл) змішують, і суміш знегажують  $N_2$  протягом 10хв. Додають [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій(II) (7,98 г 10,6 ммоль). Барботують азотом протягом 2 додаткових хвилин, і однією порцією додають 2-[(1S, 2S)-2-ізопропілциклопропіл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан (22,2 г, 106 ммоль). Одержану суміш перемішують при температурі 80 °C протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, додають  $H_2O$ , і екстрагують EtOAs. Органічний шар відокремлюють, сушать над безводним  $MgSO_4$ , і концентрують при зниженому тиску. Одержаний залишок очищують хроматографуванням на діоксиді кремнію, елюючи сумішшю 85 % гексанів/EtOAs, і виділяють вказану в заголовку сполуку (21,5 г, 92 %) у вигляді масла бурштинового кольору після видалення розчинника з хроматографічної фракції. Масло твердне при стоянні при кімнатній температурі до твердої речовини не зовсім білого кольору. ES/MS (m/z): 315 (M+1).

Препаративна методика 30

4-[(1S, 2S)-2-(Диформетил)циклопропіл]-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин

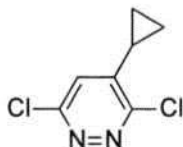


До знегаженої суспензії 3-хлор-4-[(1S, 2S)-2-(диформетил)циклопропіл]-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазину (502 мг, 1,46 ммоль) та 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероценпаладію(II) дихлориду (53 мг, 0,07 ммоль) у THF (6 мл) додають

диметилцинк (2М в толуолі, 1,5 мл, 3,0 ммоль). Гріють при температурі 60 °С у герметизованій посудині протягом 2 год. Дозволяють охолонути до кімнатної температури. Додають насичений водний розчин NH<sub>4</sub>Cl, і екстрагують DCM (3х). Органічні шари об'єднують, сушать над безводним MgSO<sub>4</sub>, і розчинник видаляють при зниженому тиску. Очищують хроматографуванням на силікагелі, елюент: EtOAc, і одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді залишку жовтого кольору (433 мг, 91,8 %) після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): 323 (M+1).

Препаративна методика 31

3,6-дихлор-4-циклопропілпіридазин



10

15

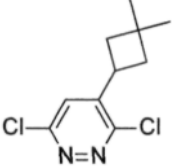
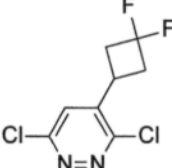
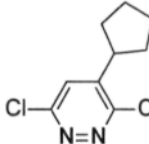
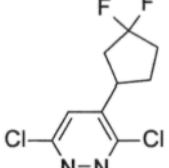
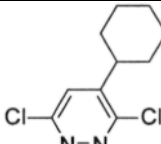
20

До суспензії 3,6-дихлорпіридазину (10,00 г, 67,12 ммоль) у воді (300 мл) додають 10 мл концентрованої H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і циклопропанкарбовону кислоту (5,85 мл, 73,7 ммоль), гріють при температурі 70 °С, і знегажують N<sub>2</sub>. Протягом 30 с додають розчин AgNO<sub>3</sub> (2,28 г, 13,4 ммоль) в 10 мл H<sub>2</sub>O, після чого краплями протягом 30 хв. додають розчин (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (46 г, 201,577 ммоль) у 150 мл H<sub>2</sub>O. Через годину дозволяють суміші охолонути до кімнатної температури, і виливають на лід, рН доводять до 9 додаванням концентрованого NH<sub>4</sub>OH. Розбавляють EtOAc, і відокремлюють органічний шар. Водний шар екстрагують додатковою кількістю EtOAc. Органічні шари об'єднують, сушать над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і випарюють розчинник при зниженому тиску. Очищують методом хроматографії з оберненою фазою (C18 Gold, 415 г, градієнт 25-100 % ACN у 10 мМ бікарбонаті амонію; 150 мл/хв., протягом 30 хв.), і виділяють вказану в заголовку сполуку (6,83 г, 54 %) у вигляді твердої речовини білого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 189/191.

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано у Препаративній методиці 22.

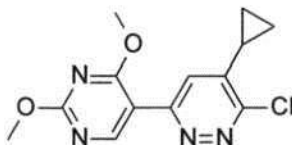
25

Препаративна методика №	Хімічна назва	Хімічна структура	ES/MS (m/z) ( <sup>35</sup> Cl/ <sup>37</sup> Cl)
32	Рацемічний транс-3,6-дихлор-4-(2-ізопропілциклопропіл)піридазин		231/233
33	Рацемічний транс-3,6-дихлор-4-(2-етилциклопропіл)піридазин		217/219
34	3,6-Дихлор-4-(2,2-дифторциклопропіл)піридазин		225/227
35	Рацемічний транс-3,6-дихлор-4-[2-(дифторметил)циклопропіл]піридазин		239/241
36	Рацемічний транс-3,6-дихлор-4-[2-(1,1-дифторетил)циклопропіл]піридазин		253/255
37	3,6-Дихлор-4-циклобутилпіридазин		203/205

38	3,6-Дихлор-4-(3,3-диметилциклобутил)піридазин		231/233
39	3,6-Дихлор-4-(3,3-дифторциклобутил)піридазин		239/241
40	3,6-Дихлор-4-циклопентилпіридазин		217/219
41	3,6-Дихлор-4-(3,3-дифторциклопентил)піридазин		253/255
42	3,6-Дихлор-4-циклогексил піридазин		231/233

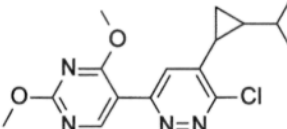
## Препаративна методика 43

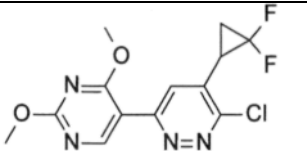
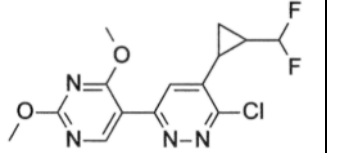
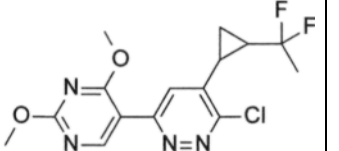
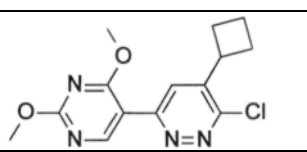
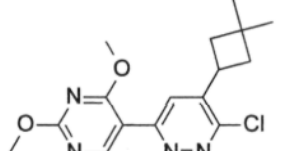
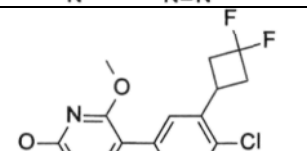
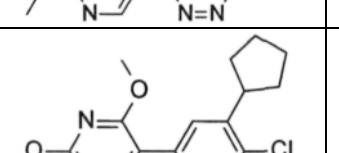
3-Хлор-4-циклопропіл-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин



- 5 Змішують (2,4-диметоксипіримідин-5-іл)боронову кислоту (4,60 г, 25,0 ммоль), 3,6-дихлор-4-циклопропілпіридазин (5,2 г, 28 ммоль),  $K_2CO_3$  (4,4 г, 32 ммоль), 1,4-діоксан (125 мл) та  $H_2O$  (42 мл), і суміш знегажують  $N_2$  протягом 10 хв. Додають комплекс [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II) дихлорметан (1,5 г, 1,8 ммоль), і додатково знегажують  $N_2$ . Одержану суміш перемішують при температурі 60 °C протягом 1 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, додають  $H_2O$ , і екстрагують EtOAc.
- 10 Відокремлюють органічний шар. Екстрагують водний шар додатковим EtOAs. Органічні шари об'єднують, сушать над безводним  $Na_2SO_4$ , і випарюють розчинник при зниженому тиску. Одержаний залишок очищають хроматографуванням на діоксиді кремнію, елюючи сумішшю 70 % гексанів/(3:2 ацетон: DCM), і виділяють вказану в заголовку сполуку (2,4 г, 33 %) у вигляді
- 15 твердої речовини світло-жовтого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): ( $^{35}Cl/^{37}Cl$ ) 293/295 [M+1]<sup>+</sup>

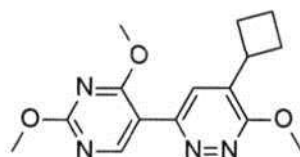
Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано в Препаративній методиці 6.

Препаративна методика №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) ( $^{35}Cl/^{37}Cl$ )
44	Рацемічний транс-3-хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-4-(2-ізопропілциклопропіл)піридазин		335/337

45	Рацемічний 3-хлор-4-(2,2-дифторциклопропіл)-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин		329/331
46	Рацемічний транс-3-хлор-4-[2-(диформетил)циклопропіл]-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин		343/345
47	Рацемічний транс-3-хлор-4-[2-(1,1-дифторетил)циклопропіл]-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин		357/359
48	3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл) піридазин		307/309
49	3-Хлор-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-4-(3,3-диметилциклобутил)піридазин		335/337
50	3-Хлор-4-(3,3-дифторциклобутил)-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин		343/345
51	3-Хлор-4-циклопентил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин		321/323

#### Препаративна методика 52

##### 4-Циклобутил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазин

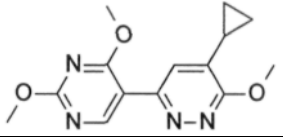
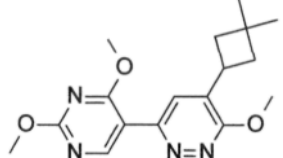
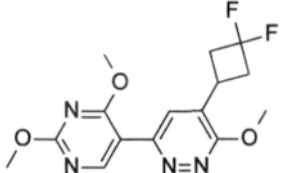
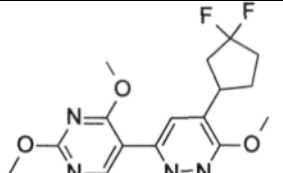
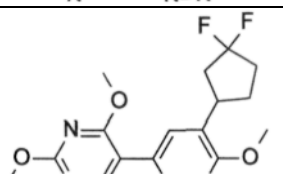
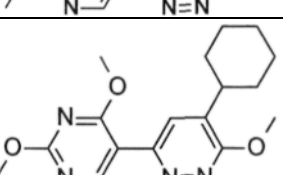


5 3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин, одержаний відповідно до Препаративних методик 21 і 33 з циклобутилкарбонової кислоти.

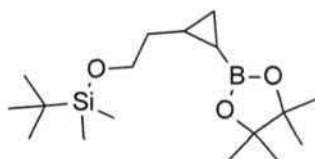
3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазин (0,42 г, 1,4 ммоль) додають до розчину NaOMe, одержаного розчиненням Na (0,16 г, 6,8 ммоль) у MeOH (12 мл). Вказану суміш гріють у закритій посудині при температурі 60 °C протягом ночі. Суміші дозволяють охолонути до кімнатної температури, додають 50 % насичений водний розчин NaCl, і екстрагують DCM (3х). Органічні шари об'єднують, і сушать над безводним MgSO<sub>4</sub>. Розчинник видаляють при зниженому тиску, і одержують вказану в заголовку сполуку (0,38 г, 93 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): 303 (M+1).

15 Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано у Препаративній методиці 52.



Препаративна методика №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) (M+H)
53	4-Циклопропіл-6-(2,4-диметоксипіридин-5-іл)-3-метоксипіридазин		289
54	5-[5-(3,3-Диметилциклобутил)-6-метоксипіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин		331
55	4-(3,3-Дифторциклобутил)-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазин		339
56	4-(3,3-Дифторциклопентил)-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазин (Ізомер 1)		353
57	4-(3,3-Дифторциклопентил)-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазин (Ізомер 2)		353
58	4-Циклогексил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазин		331

Препаративна методика 59  
 транс-трет-Бутилдиметил-[2-[2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)циклопропіл]етокси]силан

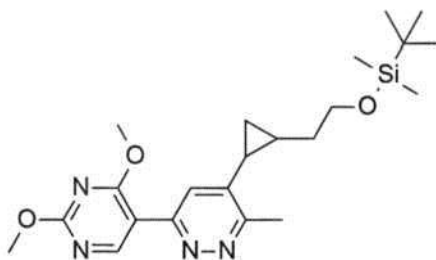


5

Може бути одержаний по суті так, як описано в Препаративній методиці 3, з наявного у продажу трет-бутилдиметил-[(E)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)бут-3-енокси]силану. <sup>1</sup>H ЯМР (400,13 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 3,70-3,66 (m, 2H), 1,51-1,38 (m, 2H), 1,23 (s, 12H), 1,04-0,96 (m, 1H), 0,91 (s, 9H), 0,71-0,67 (m, 1H), 0,46-0,41 (m, 1H), 0,07 (s, 6H), -0,38 (dt, J=9,3 Гц, 5,8 Гц, 1H).

10

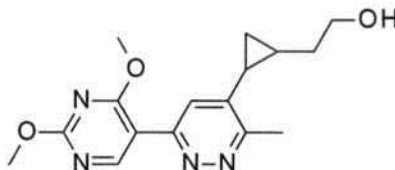
Препаративна методика 60  
 транс-трет-Бутилдиметил-[2-[2-[6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етокси]силан



Може бути одержаний по суті так, як описано в Препаративній методиці 4. ES/MS(m/z):417(M+1).

Препаративна методика 61

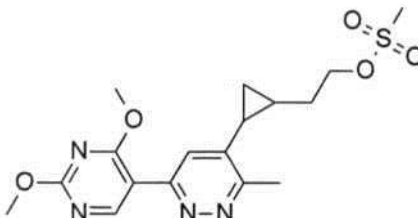
5 транс-2-[2-[6-(2,4-Диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етанол



Фторид тетрабутиламонію (5 мл, 5 ммоль, 1М у THF) та транс-трет-бутилдиметил-[2-[2-[6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етокси]силан (1,15 г, 8,9 ммоль) додають в DCM (3 мл), і перемішують при температурі 60 °С протягом 1 год. Дозволяють охолонути до кімнатної температури. Розбавляють DCM (80 мл), і промивають насиченим розчином NH<sub>4</sub>Cl (3 × 30 мл). Органічні шари об'єднують, сушать над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і розчинник видаляють при зниженому тиску. Очищають хроматографуванням на силікагелі, елюент: 0-30 % MeOH/EtOAc, і одержують вказану в заголовку сполуку (0,53 г, 53 %) у вигляді твердої речовини білого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS(m/z): 317 (M+1). <sup>1</sup>H ЯМР (399,80 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 8,92 (s, 1H), 7,29 (m, 1H), 4,03 (s, 3H), 4,02 (s, 3H), 3,81 (t, J=6,2 Гц, 2H), 2,76 (s, 3H), 1,73-(m, 3H), 1,26 (m, 2H), 1,03(m, 2H).

Препаративна методика 62

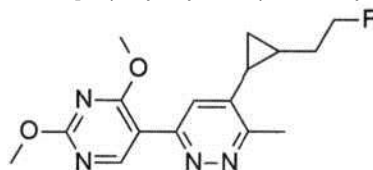
15 транс-2-[2-[6-(2,4-Диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етилметансульфонат



20 Метансульфонілхлорид (0,2 мл, 3 ммоль) додають до розчину транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етанолу (0,390 г, 1,22 ммоль) та N, N-діізопропілетиламіну (0,4 мл, 2 ммоль) в DCM (8 мл) при температурі 0 °С в атмосфері N<sub>2</sub>. Перемішують при температурі 0 °С протягом 40 хв. Розбавляють 50 мл DCM, і промивають 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 мл) і водою (30 мл). Органічні шари об'єднують, сушать над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і розчинник видаляють при зниженому тиску. Очищають хроматографуванням на силікагелі, елюент: 0-20 % MeOH/EtOAc, і одержують вказану в заголовку сполуку (0,280 г, 58 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): 395 (M+1). <sup>1</sup>H ЯМР (399,80 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 8,98 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 4,37 (t, J=6,2 Гц, 2H), 4,07 (s, 3H), 4,05 (s, 3H), 3,01 (s, 3H), 2,81 (s, 3H), 2,04 (m, 1H), 1,90-1,78 (m, 2H), 1,27 (m, 1H), 1,06 (t, J=7,1 Гц, 2H).

Препаративна методика 63

30 транс-2,4-Диметокси-5-[6-метил-5-[2-(2-фторетил)циклопропіл]піридазин-3-іл]піримідин



35 Гідрат тетрабутиламонію фториду (3 мл, 3 ммоль, 1М у THF) додають до розчину транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метилпіридазин-4-іл]циклопропіл]етилметансульфонату

(0,280 г, 0,71 ммоль) у THF (3 мл). Нагрівають при температурі 70 °С протягом 2 год. Дозволяють охолонути до кімнатної температури. Розбавляють EtOAc, промивають насиченим водним розчином NaCl, сушать над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і видаляють розчинник при зниженому тиску. Очищають хроматографуванням на силікагелі, елюент: 0-20 % MeOH/EtOAc, і одержують

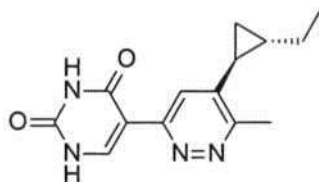
вказану в заголовку сполуку (0,170 г, 71 %) у вигляді масла блідо-жовтого кольору після видалення розчинника з хроматографічних фракцій. ES/MS (m/z): 319 (M+1). <sup>1</sup>H ЯМР (399,80 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 9,01 (m, 1H), 7,39 (s, 1H), 4,67-4,52 (dt, J H-F 48 Гц, J=6,7 Гц, 2H), 4,08 (s, 3H), 4,07 (s, 3H), 2,83 (s, 3H), 2,00-1,94 (m, 3H), 1,27 (m, 1H), 1,06 (m, 2H).

Хіральне розділення: колонка Lux Cellulose-4, 250 × 21 мм, швидкість потоку 70 г/хв., елюент: 40 % MeOH/CO<sub>2</sub>.

Енантіомер 1>99 % ee, rt 2,59 хв. (Lux Cellulose-4, 4,6 × 150 мм, 40 % MeOH/CO<sub>2</sub>, 5 мл/хв., 225 нм). Енантіомер 2>99 % ee. rt 3,34 хв. (Lux Cellulose-4, 4,6 × 150 мм, 40 % MeOH/CO<sub>2</sub>, 5 мл/хв., 225 нм).

Приклад 1

5-[5-[(1S, 2S)-2-Етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон



5-[5-[(2-етилциклопропіл)-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин (ізомер 1) (197 мг, 0,66 ммоль) розчиняють у 1М водному розчині HCl (4 мл), і нагрівають одержану суміш до температури 70 °С протягом ночі. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, заморожують на бані з сумішшю ацетон/сухий лід при температурі -78 °С, видаляють розчинник ліофілізацією, і одержують вказану в заголовку сполуку (0,176 г, 97 %) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору. ES/MS (m/z): 273 (M+H).

<sup>1</sup>H ЯМР (d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1,00 (t, J=7,3 Гц, 3H), 1,11-1,16 (m, 1H), 1,27-1,33 (m, 2H), 1,47-1,52 (m, 2H), 1,92-1,96 (m, 1H), 2,80 (s, 3H), 8,00 (s, 1H), 8,41 (d, J=5,5 Гц, 1H), 11,73 (s, 1H), 11,99-11,91 (m, 1H).

Альтернативна методика для Прикладів 1-5

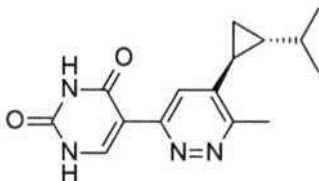
Суспензію з 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідину (16,2 г, 51,5 ммоль) і 1М водного розчину HCl (135 мл, 135 ммоль) перемішують при температурі 45 °С протягом 16 год. Охолоджують до кімнатної температури, додають 2М водний розчин K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> до pH~6 (приблизно 150 мл), і перемішують при кімнатній температурі протягом 16 год. Фільтрують, і збирають одержану тверду речовину, промивають водою, сушать у вакуумній печі при температурі 45 °С протягом 16 год., і одержують вказану в заголовку сполуку (13,8 г, 93 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): 273 (M+1).

Кристалізація 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону

5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон розчиняють у метанолі, перемішують при температурі 50 °С протягом 1 год., і дозволяють охолонути до температури навколишнього середовища з його кристалізацією з розчину. Тверді речовини виділяють вакуумною фільтрацією, і короткочасно сушать у вакуумі при температурі 70 °С.

Приклад 2

5-[5-[(1S, 2R)-2-Ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон



транс-5-[5-[2-Ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідин (ізомер 1) (628 мг, 2,00 ммоль) розчиняють у MeOH (3 мл). Додають 1М водний розчин HCl (5 мл), і нагрівають до температури 70 °С протягом 3 год. Охолоджують до кімнатної температури, завантажують реакційну суміш на колонку SCX, промиту MeOH (20 г, Silicycle SILIABOND Tonic Acid), промивають SCX колонку MeOH (140 мл), та елюють потрібний продукт 2М NH<sub>3</sub>/MeOH (140 мл). Фракції NH<sub>3</sub>/MeOH концентрують до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді

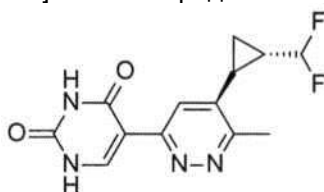
твердої речовини кремового кольору (546 мг, 95 %). ES/MS (m/z): 287 (M+H). <sup>1</sup>H ЯМР (d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 0,99 (m, 9H), 1,24 (m, 1H), 1,81 (m, 1H), 2,72 (s, 3H), 7,67 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 11,43 (bs, 2H).

Альтернативна методика для Прикладів 1-5

Суспензію 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-2,4-диметоксипіримідину (21,5 г, 65,6 ммоль) та 1М водний розчин HCl (165 мл, 135 ммоль) перемішують при температурі 45 °С протягом 16 год. Охолоджують до кімнатної температури, і екстрагують MTBE. Органічну фазу видаляють, і у водну фазу додають 2М водний розчин K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> до рН~6 (приблизно 150 мл). Одержану суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Фільтрують, збирають одержану тверду речовину, промивають водою, сушать у вакуумній печі при температурі 45 °С протягом 16 год., і одержують вказану в заголовку сполуку (14,3 г, 76 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): 287 (M+1).

Приклад 3

5-[5-[2-(Дифторметил)циклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон



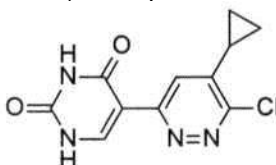
5-[5-[2-(дифторметил)циклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон може бути одержаний по суті так, як описано в Прикладі 1.

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано в Прикладі 1.

Приклад №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) (M+H)
4	5-[6-Метил-5-[rel-(1S, 2S)-2-ізобутилциклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		301
5	5-[6-Метил-5-[rel-(1S, 2S)-2-(1,1-дифторетил)циклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		309
6	5-[5-[(1S, 2S)-2-(Дифторметил)циклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		281

Приклад 7

5-(6-Хлор-5-циклопропілпіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діон



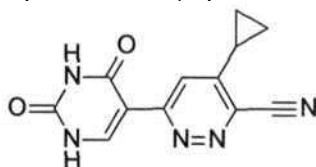
1М HCl (14 мл, 14 ммоль) додають до розчину 3-хлор-4-циклопропіл-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)піридазину (1,0 г, 3,4 ммоль) у MeOH (17 мл), і перемішують при температурі 50 °С протягом ночі. Розчинник видаляють при зниженому тиску, і одержують вказану в заголовку сполуку (0,9 г, 100 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 265/267.

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано в Прикладі 7.

Приклад №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) ( <sup>35</sup> Cl/ <sup>37</sup> Cl)
8	5-[6-Хлор-5-[rel-(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		307/309
9	5-[6-Хлор-5-[rel-(1R)-2,2-дифторциклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		301/303
10	5-[6-Хлор-5-[(1S, 2S)-2-(диформетил)циклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		315/317
11	5-[6-Хлор-5-[rel-(1S, 2S)-2-(1,1-дифторетил)циклопропіл]піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		329/331
12	5-(6-Хлор-5-циклобутилпіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діон; гідрохлорид		279/281
13	5-[6-Хлор-5-(3,3-диметилциклобутил)піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		307/309
14	5-[6-Хлор-5-(3,3-дифторциклобутил)піридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		315/317
15	5-(6-Хлор-5-циклопентилпіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діон		293/295

## Приклад 16

4-Циклопропіл-6-(2,4-діоксо-1Н-піримідин-5-іл)піридазин-3-карбонітрил



- 5 Розчин 5-(6-хлор-5-циклопропілпіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діона (А, 57 мг, 0,22 ммоль, 100 % (мас.)) у DMF (1 мл, 12,9 ммоль) знегажують N<sub>2</sub>. Додають Zn(CN)<sub>2</sub> (20 мг, 0,22 ммоль),

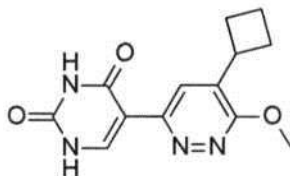
трис(добензиліденацетон)дипаладій(0) (5 мг, 0,0054 ммоль) та 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен (6 мг, 0,011 ммоль), і додатково знегажують N<sub>2</sub>. Кришку щільно закривають, і гріють при температурі 120 °C протягом ночі. Охолоджують до кімнатної температури, і фільтрують через діатомову землю. Очищають методом хроматографії з оберненою фазою (C18 Gold 15,5 г, градієнт 5-20 % ACN в 10 mM гідрокарбонаті амонію; 20 об'ємів колонки), і виділяють вказану в заголовку сполуку (0,032 г, 58 %) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору. ES/MS (m/z): 256 (M+1).

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано в Прикладі 16.

Приклад №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) (M+H)
17	6-(2,4-Діоксо-1H-піримідин-5-іл)-4-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]піридазин-3-карбонітрил		298
18	6-(2,4-Діоксо-1H-піримідин-5-іл)-4-[rel-(1S, 2S)-2-(дифторметил)циклопропіл]піридазин-3-карбонітрил		306
19	4-Циклобутил-6-(2,4-діоксо-1H-піримідин-5-іл)піридазин-3-карбонітрил		270
20	4-Циклопентил-6-(2,4-діоксо-1H-піримідин-5-іл)піридазин-3-карбонітрил		284
21	4-[(1S)-2,2-Дифторциклопропіл]-6-(2,4-діоксо-1H-піримідин-5-іл)піридазин-3-карбонітрил		292
22	6-(2,4-Діоксо-1H-піримідин-5-іл)-4-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]піридазин-3-карбонітрил		284

#### Приклад 23

5-(5-Циклобутил-6-метоксипіридазин-3-іл)-1H-піримідин-2,4-діон

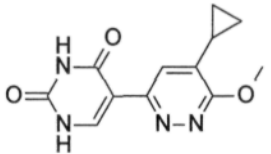
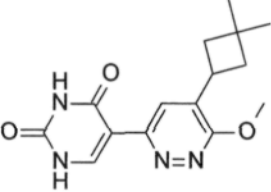
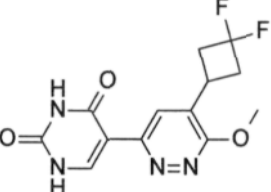
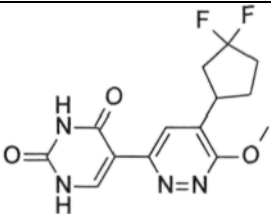
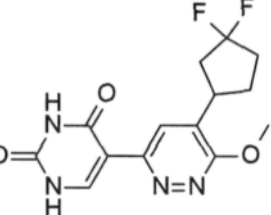
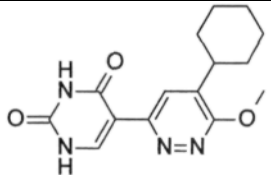


1M HCl (5,2 мл, 5,2 ммоль) додають до 4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипіримідин-5-іл)-3-метоксипіридазину (0,39 г, 1,3 ммоль), і перемішують при температурі 50 °C протягом 6 год., після чого при кімнатній температурі протягом ночі. Видаляють розчинник при зниженому тиску. Очищають із застосуванням SCX картриджу (10 г, елюенти: 60 мл DCM, 60 мл 50 % MeOH у

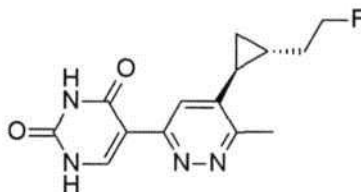
DCM і 120 мл 50 % 7М NH<sub>3</sub> в MeOH в DCM), і одержують вказану в заголовку сполуку (0,337, 96 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): 275 (M+1).

Наведені нижче приклади сполук можуть бути одержані по суті так, як описано в Прикладі 23.

5

Приклад №	Хімічна назва	Структура	ES/MS (m/z) (M+H)
24	5-(5-Циклопропіл-6-метоксипіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діон		261
25	5-[5-(3,3-Диметилциклобутил)-6-метоксипіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		303
26	5-[5-(3,3-Дифторциклобутил)-6-метоксипіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон		311
27	5-[5-(3,3-Дифторциклопентил)-6-метоксипіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон (Ізомер 1)		325
28	5-[5-(3,3-Дифторциклопентил)-6-метоксипіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон (Ізомер 2)		325
29	5-(5-Циклогексил-6-метоксипіридазин-3-іл)-1Н-піримідин-2,4-діон		303

Приклад 30 5-[5-[(1S, 2R)-2-(2-Фторетил)циклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон



10

HCl (1M у H<sub>2</sub>O, 2 мл, 2 ммоль) додають до Енантіомеру 1 транс-2,4-диметокси-5-[6-метил-5-[2-(2-фторетил)циклопропіл]піридазин-3-іл]піримідину (0,043 г, 0,14 ммоль), і гріють при температурі 50 °C протягом ночі. Видаляють розчинник при зниженому тиску. Очищають із застосуванням SCX картриджу (12 г, елюенти: 70 мл MeOH, 70 мл 2М NH<sub>3</sub> в MeOH), і

одержують вказану в заголовку сполуку (0,037 г, 89 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. ES/MS (m/z): 291 (M+1).

#### Біологічні аналізи

5 Наведені далі дослідження демонструють, що наведені як приклад сполуки за цим винаходом є інгібіторами активності CD73 і корисні при лікуванні раку.

#### Експресія та очищення білка CD73

10 С-кінцевий 6-HIS-мічений людський CD73 (амінокислоти 1-547) експресується в клітинах ссавців HEK293F шляхом тимчасової трансфекції клітин геном CD73 та очищення із застосуванням метал-афінної хроматографії на колонках з іммобілізованим іоном  $Ni^{2+}$  та гель-хроматографії за розміром молекул Superdex 200. С-кінцевий 6-HIS-мічений мишачий CD73 (амінокислоти 1-549) експресується та очищається так, як описано вище. С-кінцевий 6-HIS-мічений пацючий CD73 (амінокислоти 1-549) експресується та очищається так, як описано раніше.

#### Мас-спектроскопія на аденозин та очищення аденозину

15 Автоматизована екстракційна система Agilent 300 RapidFire (Agilent, Santa Clara, штат Каліфорнія) використовується з трьома чотирипоршневими насосами для вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC), поєднаними з потрійним квадрупольним мас-спектрометром Sciex 6500 (AB Sciex, Framingham, штат Масачусетс) зі спряженим джерелом іонізації електророзпилюванням (ESI). Систему RapidFire Mass Spec завантажують багаторазовим картриджем RapidFire HILIC (H1) для твердофазного екстрагування (SPE) (G9203-80109).

20 Розчинник А, що використовується для завантаження та промивання зразків - це 50 мМ розчин формиату амонію, рН 4,0, що містить 5 % (об'єми.) ACN. Розчинник В, який використовується для елюювання зразків, - це 0,3 % мурашиної кислоти + 2 % гідроксиду амонію в суміші 70 % ACN/30 % MeOH. Зразки послідовно аналізують шляхом відсмоктування під вакуумом 10 мкл на замкнений контур для збору безпосередньо з багатолункових планшетів. 10 мкл зразка завантажують на картридж HILIC, і промивають із застосуванням чотирипоршневого насоса 1, застосовуючи розчинник А, зі швидкістю потоку 1,25 мл/хв. протягом 3000 мс. Утримані досліджувані речовини елюють до мас-спектрометра із застосуванням чотирипоршневого насоса 3, застосовуючи розчинник В, зі швидкістю потоку 1,25 мл/хв. протягом 3000 мс. Систему повторно врівноважують чотирипоршневим насосом 1, застосовуючи розчинник А, зі швидкістю потоку 1,25 мл/хв. протягом 3000 мс.

30 Потрійний квадрупольний мас-спектрометр споряджають джерелом іонізації електророзпилюванням (ESI), і досліджувані речовини контролюють із застосуванням моніторингу вибраних реакцій (SRM) у позитивному режимі (M+H)<sup>+</sup>. Аденозин контролюють при m/z 268,05/136,0, а монофосфат аденозину при m/z 348,1/136,0. Значення співвідношення площ для аденозину та монофосфату аденозину обчислюють, із застосуванням <sup>13</sup>C5-аденозину та <sup>15</sup>N5-AMP, відповідно, як внутрішні стандарти.

#### Біохімічне дослідження людського CD73

40 Мета цього дослідження полягає у виявленні та охарактеризуванні інгібіторів активності ферменту CD73. Реакційні суміші (20 мкл), що містять 2 мкМ аденозинмонофосфату (Sigma, № за каталогом 01930), 10 мМ трис-буферу, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 0,01 % BSA, 0,2 мМ октилглюкозиду та 50 мкМ білка CD73, наносять на 384-лунковий планшет (Nunc, № за каталогом 264573). Після 30 хв. інкубування при кімнатній температурі реакцію припиняють додаванням 20 мкл стоп-розчину, що містить 2 % мурашиної кислоти та 10 мМ <sup>13</sup>C5-аденозину (рибоза, мічена <sup>13</sup>C5) (Cambridge Isotope Laboratories, № за каталогом CLM-3678-0), з подальшим додаванням 40 мкл dH<sub>2</sub>O. Рівні аденозину- та рибози-<sup>13</sup>C5 аденозину (внутрішній стандарт) визначають із застосуванням мас-спектрометрії так, як описано вище. Для кількісної оцінки кожної реакції використовують співвідношення сигналів (пікова інтеграція аденозину/пікова інтеграція внутрішнього стандарту для аденозину). Інгібування у відсотках обчислюють із застосуванням рівняння  $\{\% \text{ інгібування} = 100 \times [1 - (X - \text{MIN}) / (\text{MAX} - \text{MIN})]\}$ , де X відповідає співвідношенню сигналів лунки, MAX відповідає середньому співвідношенню сигналів контрольованого DMSO і MIN відповідає співвідношенню сигналів активності ферментів у присутності >10X IC<sub>50</sub> відомого конкурентного інгібітора. Для скринінгу кожен сполуку досліджують при 50 мкМ в 1 % DMSO. IC<sub>50</sub> кожної сполуки визначають дослідженням кожної сполуки в 10 концентраціях від 0,0025 мкМ до 50 мкМ (із застосуванням схеми розведення 1:3).

55 IC<sub>50</sub> для 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діона становить 0,028 мкМ.

IC<sub>50</sub> для 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діона становить 0,043 мкМ.

60 Всі сполуки Прикладів, розкриті у цьому описі, демонструють IC<sub>50</sub> меншу ніж 0,062 мкМ.



## Дослідження механізму дії людського CD73

Мета цього дослідження полягає у визначенні механізму дії сполуки, яка чинить інтерес. Дослідження проводять так, як зазначено вище для біохімічного аналізу людського CD73. Кожну сполуку досліджують у 8 різних концентраціях від 0,023 мкМ до 50 мкМ за схемою розведення 1:3, але при 8 різних концентраціях AMP від 0,023 мкМ до 50 мкМ із застосуванням 3-кратної схеми розведення. Співвідношення площі для різних концентрацій інгібітору та субстрату наносять на графік із застосуванням GraphPad Prism 7.00, і підганяють із застосуванням спеціальної змішаної моделі інгібування для визначення значень  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$  та альфа інгібування  $\{(V_{maxapp}=V_{max}/(1+[I]/(\alpha * K_i))$ ;  $K_{mapp}=K_m * (1+[I]/K_i)/(1+[I]/(\alpha * K_i))$ ;  $Y=V_{maxapp} * X/(K_{mapp}+X)$ , де альфа,  $V_{max}$ ,  $K_m$  і  $K_i$  є спільними для кожної сполуки.

Кожен з 5-[5-[(1S, 2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону та 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону є неконкурентним інгібітором, який зв'язується з ферментно-фосфатним комплексом, але не з самим апоферментом.

Підвищення субстратних концентрацій AMP підвищує активність неконкурентних інгібіторів, наприклад, 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону, оскільки значення його  $IC_{50}$  знижені, як показано в Таблиці 1.

Таблиця 1

AMP (мкМ)	$IC_{50}$ (мкМ)
50,0	0,008327
16,7	0,006557
5,6	0,008799
1,9	0,02028
0,61	0,06279
0,21	0,1513
0,069	0,2903
0,023	0,4094

## Дослідження механізму дії мишачого CD73

Метою цього дослідження є оцінювання інгібіторів щодо їх інгібування активності мишачого ферменту CD73. Це дослідження проводять так, як описано вище для біохімічного дослідження людського CD73, за винятком того, що використовують 3 мкМ AMP та 50 пМ мишачого ферменту CD73.

$IC_{50}$  для 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону становить 0,175 мкМ.

## Дослідження людських клітин Calu6

Мета цього дослідження полягає в тестуванні сполук проти CD73 в дослідженні на клітинній основі. Клітини Calu6 (1500 клітин/лунка) вирощують на 96-лунковому планшеті, сенсibiliзованому полі-D-лізином (BD, № за каталогом 356640), що містить 100 мкл живильного середовища (MEM (мінімальне підтримувальне середовище) (Gibco, № за каталогом 11095-072) + 1 % пірувату натрію (Gibco, № за каталогом 11360-070) + 1 % NEAA (розчин замісних амінокислот) (Gibco, № за каталогом 11140-050) + 10 % FBS (Hyclone, № за каталогом SH30071)). Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. з подальшим інкубуванням протягом ночі при температурі 37 °C/5 %  $CO_2$ .

Клітини двічі промивають аналітичним буфером (10 мМ Трис-HCl, pH 7,2, 10 мМ D-глюкози, 1 мМ KCl, 125 мМ NaCl, 2 мМ  $MgCl_2$ ) (90 мкл/лунка). Потім в кожному лунку додають 90 мкл аналітичного буферу з подальшим додаванням 10 мкл на лунку AMP та преміксу сполуки (50 мМ AMP, змінні концентрації сполуки в 1 % DMSO). Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 60 хв., потім видаляють 10 мкл супернатанту/лунку, і додають на новий планшет з подальшим додаванням 20 мкл стоп-розчину (2 % мурашиної кислоти, 1,2 мМ рибози- $^{13}C_5$  аденозину (Cambridge Isotope Laboratories, № за каталогом CLM-3678-0) та 90 мкл  $ddH_2O$  для мас-спектрометричного аналізу. Рівні аденозину та рибози- $^{13}C_5$  аденозину (внутрішній стандарт) визначають мас-спектрометрією (Agilent RapidFire) так, як описано вище для біохімічного дослідження людського CD73. Інгібування у відсотках також обчислюють так, як описано вище.

$IC_{50}$  для 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону становить 0,0073 мкМ (сполука Прикладу 2).

IC<sub>50</sub> для 5-[5-[(1S, 2R)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону становить 0,028 мкМ.

Ех vivo дослідження цільового інгібування

5 Мета цього дослідження полягає в тестуванні сполук проти мишачого CD73 в крові мишей в ех vivo дослідженні. Тваринам (6/групу) пероральним шляхом вводять кожну сполуку, приготувану у 20 % HPBCD (2-гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрин), рН 2, після того, як об'єм пухлин досягає приблизно 400 мм<sup>3</sup>. Після обробки кров відбирають у гепаринізовані пробірки, та використовують для ех vivo дослідження конверсії <sup>13</sup>C10-<sup>15</sup>N5-AMP на мічений аденозин, інозин та гіпоксантин так, як описано для ех vivo дослідження з використанням цільної крові, зібраної у тварин, яких піддавали обробці сполуками шляхом перорального дозування.

10 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон інгібує конверсію AMP на аденозин, інозин та гіпоксантин у цільній мишачій крові тварин, які були оброблені різними дозами сполуки так, як показано в Таблиці 2.

Таблиця 2

Інгібування конверсії AMP на аденозин		
Група	Інгібування (%)	р-значення
Носій	0,0	1,000
1 мг/кг	-10,6	0,9139
2,5 мг/кг	25,2	0,162
6,4 мг/кг	37,0	0,0127*
16 мг/кг	56,5	<0,0001*
40 мг/кг	88,6	<0,0001*
100 мг/кг	94,3	<0,0001*

\* - статистична значущість

15

IC<sub>50</sub> для 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діону становить 0,0073 мкМ.

In vivo дослідження цільового інгібування людського CD73 на основі пухлинних клітин Calu6

20 Мета цього дослідження полягає в тестуванні сполук проти людського CD73 на пухлинних ксенотрансплантатах, які походять з людських ракових клітин Calu6, в дослідженні цільового інгібування in vivo. Клітини Calu6 (ATCC) вирощують у середовищі HBSS, доповненому 10 % ембріональної бичачої сироватки. Субконфлюентні клітини збирають трипсином, і двічі промивають безсироватковим середовищем для вирощування. Піст підшкірних пухлин ініціюють введенням 5 × 10<sup>6</sup> клітин у суміші HBSS та MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, штат Нью-Джерсі) в задню частину боку "голих" мишей (The Harlon Laboratory). Коли середній об'єм пухлини досягне приблизно 400-500 мм<sup>3</sup>, тварин рандомізують за розміром пухлин та масою тіла, і розміщують у відповідні досліджувані групи так, як зазначено. Після обробки зразки пухлин (по 50-80 мг кожної) збирають, і обробляють в 1 мл холодного екстракційного буфера, який містить внутрішні стандарти, так, як описано нижче.

25

30 В ступку для попереднього охолодження вносять смужку фольги і рідкий N<sub>2</sub>. Пухлинну тканину накривають іншою смужкою фольги, і товкачиком розбивають пухлину до її повного подрібнення. Від 50 мг до 100 мг пухлинної тканини поміщають у пробірки (Fisher Scientific, № за каталогом 02-681-302), і поміщають на сухий лід. В пробірки вносять по одній металевій кульці (Qiagen, № за каталогом 69989) та по 1 мл 80 % метанолу, який містить внутрішні стандарти <sup>13</sup>C5-аденозин, <sup>13</sup>C5-AMP, <sup>15</sup>N5-GTP, <sup>15</sup>N4-інозин-5'-монофосфат та <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>M-гіпоксантин (Cambridge Isotope Lab та Cayman Chemical), і зразки зберігають при температурі -80 °C до застосування для LC/MS дослідження.

35

Кров також відбирають у гепаринізовані пробірки та використовують для ех vivo дослідження конверсії <sup>13</sup>C5-<sup>15</sup>N5-AMP на мічений аденозин, інозин та гіпоксантин так, як описано для дослідження ех vivo, використовуючи цільну кров, зібрану у тварин, яких піддавали обробці сполуками шляхом перорального дозування.

40

Як показано в Таблиці 3, 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діон інгібує конверсію AMP на аденозин в пухлинах Calu6, оброблених різними дозами згаданої сполуки.

45

Таблиця 3

Інгібування конверсії АМР на аденозин		
Група, оброблювана сполукою (мг/кг)	Інгібування (%)	p-значення
0,0	0	1,000
1,0	39,1	0,0057*
2,5	68,5	<0,0001*
6,4	64,3	<0,0001*
16,0	77,5	0,0001*
40,0	82,1	0,0001*
100,0	89,3	0,0001*

\* - статистична значущість.

#### Дослідження супресії Т-клітин

Карбоксифлюоресцеїндіацетат-сукцинімідиловий складний ефір (CFSE) використовується як маркувальний агент. РВМС (мононуклеари периферичної крові) людини або ізольовані клітини CD4 ( $0,5 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  клітин) промивають маркувальним буфером (RPMI 1640 w/L-глутамін, GIBCO, № за каталогом 11875), що містить 5 % HI FBS (Gibco, № за каталогом 10082), і суспендують в 1 мл маркувального буфера. Клітини змішують з 110 мкл PBS, що містить 50 мкМ CFSE (Biolegend, № за каталогом 423801), і інкубують при кімнатній температурі протягом 5 хв. Мічені клітини промивають один раз PBS, який містить 5 % HI FBS (Gibco, № за каталогом 10082), і один раз нормальним середовищем для вирощування Т-клітин (X-Vivo 15, Lonza, № за каталогом 04-744Q), яке містить їх пеніцилін/стрептоміцин, і суспендують у середовищі для вирощування, яке використовують для РВМС та клітин CD4.

#### Активация та обробка Т-клітин

Мічені CFSE людські РВМС (600000 клітин/мл) або клітини CD4 (500000 клітин/мл) змішують з Т-активатором людських CD3/CD28 Dynabeads® (Gibco, № за каталогом 11131D) у співвідношенні клітини/гранули 1:1 та людським IL-2 (60 МОд/мл, Roche, № за каталогом 11011456001). Клітини поміщають на водяну баню при температурі 37 °C на 10 хв. для попередньої активації Т-клітин. РВМС (125 мкл/лунку) або клітини CD4 (100 мкл/лунку) переносять на 96-лунковий планшет (Costar 3799, Corning Inc.). Для тестування сполук із застосуванням РВМС, досліджувані сполуки в різних концентраціях готують у нормальних середовищах для вирощування клітин (125 мкл), які містять 400-600 мкМ АМР. Для тестування сполук із застосуванням клітин CD4, досліджувані сполуки в різних концентраціях готують у нормальних середовищах для вирощування клітин (100 мкл), які містять 200-250 мкМ АМР. Оброблені клітини культивують при температурі 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, протягом 68-70 годин.

Середовище (160 мкл), яке містить оброблені РВМС, переносять на планшет, та решту середовища, яке використовують для дослідження на цитокіни, переносять на планшети AcroPrep 96 (AcroPrep 96 Filter plate, Omega 3K NTRL 350 мкл лунка, Pall Life Science, № за каталогом 8033) для підготовки зразків для LC-MS дослідження метаболітів.

Середовище (100 мкл), яке містить клітини CD4, переносять, і відфільтровують через планшети AcroPrep на інший планшет шляхом центрифугування при 1500 g протягом 2 год. Відфільтроване середовище (50 мкл/лунку) змішують з таким самим об'ємом 80 % метанолу, 1 % NH<sub>4</sub>OH та внутрішніми стандартами (250 нг/мл <sup>13</sup>C5-АМР та 250 нг/мл <sup>13</sup>C5-аденозину) для LC-MS дослідження метаболітів.

Оброблені РВМС або клітини CD4 збирають, і забарвлюють для проточної цитометрії для кількісного оцінювання проліферації Т-клітин.

#### Проточна цитометрія

Клітини РВМС або CD4 забарвлюють Zombie Aqua (Biolegend, № за каталогом 423102, партія № B195875) при розведенні 1:200 в DPBS протягом 15 хв. з подальшим блокуванням інгібітором зв'язування людського рецептора Fc-фрагмента (Bioscience, № за каталогом 14-9161-73). 73) при розведенні 1:5 протягом 15 хв. у буфері для проточного забарвлювання (DPBS (фізіологічний розчин, забуферений фосфатом Дульбекко) - 2 % HIFBS (термоінактивована ембріональна бичача сироватка) - 0,5 % BSA (бичачий сироватковий альбумін)) на льоді. РВМС забарвлюють коктейлем з антитіл проти CD3 людини, мічених APC/Cy7 (Biolegend, № за каталогом 300426, розведення 1:20), антитіл проти CD4 людини, мічених APC (Biolegend, № за каталогом 317416, розведення 1:20) та антитіл проти CD8a людини, забарвлених барвником Pacific Blue (Biolegend, № за каталогом 300927, розведення 1:20), та клітини CD4 забарвлюють

антитілами проти CD4 людини, міченими APC (Biolegend, № за каталогом 317416, розведення 1:20) протягом 30 хв. у буфері для проточного фарбування на льоді.

Дані проточної цитометрії збирають із застосуванням BD FACS Verse. Кожен канал флуоресценції відповідним чином компенсується. Дані обробляються із застосуванням FloJo ver. 7.6.5 із такою стратегією стробування: лімфоцити, стробовані на точковому графіку FSC (пряме світлорозсіювання) проти SSC (бічне світлорозсіювання); життєздатні клітини лімфоцитів, стробовані на точковому графіку SSC проти Zombie Aqua; клітини CD3 життєздатних лімфоцитів, стробовані на точковому графіку APC-Cy7 проти Zombie Aqua; клітини CD4 та клітини CD8 клітин CD3, стробовані на точковому графіку APC проти Pacific Blue; клітини CD4 та CD8, крім того стробовані на точкових графіках APC проти CFSE(FITC) та Pacific Blue проти CFSE(FITC). Проліферацію клітин CD4 та CD8 досліджують проліфераційним інструментарієм. Індекс проліферації (PI) визначають як відношення загальної кількості клітин до вихідної кількості клітин, а % вивільнення сполуки обчислюють як  $(PI_{w/o \text{ AMP}} - PI_{w \text{ AMP}}) / (PI_{w/o \text{ AMP}} - PI_{\text{сразка}}) * 100$ .

Як показано в Таблиці 4, інгібування CD73 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діоном "рятує" опосередковане аденозином інгібування проліферації Т-клітин, яке співвідноситься з дозозалежним зменшенням рівнів аденозину в середовищі для вирощування.

Таблиця 4

"Порятунок" опосередкованого аденозином інгібування проліферації Т-клітин		
Сполука (мкМ)	"Порятунок" проліферації Т-клітин (%)	Аденозин (мкМ)
5,00	107	0,017
1,66667	106	0,027
0,55556	104	0,046
0,18519	95	0,086
0,06173	37	0,15
0,02058	-2	0,21
0,00686	-3	0,28
0,00229	-6	0,28
0,00	0	0,30

#### Дослідження цитокінів

Культуральне середовище з оброблених PBMC розбавляють 1:7,5, 1:2,5 та 1:50 їх розріджувачем ELISA/ELISPOT з наборів ELISA для дослідження цитокінів та досліджують на TNF $\alpha$  із застосуванням набору Human TNF alpha ELISA Ready-SET-GO! (eBioscience, № за каталогом 88-7346-22), на IL-1 $\beta$  із застосуванням набору Human IL-1 $\beta$  ELISA Ready-SET-GO! (2-е покоління) (eBioscience, № за каталогом 88-7261-22) та на IFN $\gamma$  із застосуванням набору Human IFN gamma ELISA ready-SET-GO! (eBioscience, № за каталогом 88-7316-22), базуючись на інструкції виробника.

Як показано в Таблиці 5, інгібування CD73 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діоном підвищує рівні TNF- $\alpha$  в Т-клітинах CD4<sup>+</sup>.

Таблиця 5

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

Як показано в Таблиці 6, інгібування CD73 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1Н-піримідин-2,4-діоном підвищує рівні INF-γ в Т-клітинах CD4<sup>+</sup>.

Таблиця 6

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

#### 5 Моделі in vivo

За бажанням, доклінічне моделювання результату інгібування CD73 сполукою за цим винаходом або її фармацевтично прийнятною сіллю, може бути здійснено, наприклад, за способами, викладеними в цій галузі, наприклад, у Rongvaux A, et al., Annual Rev. Immunology 2013; 31: 635-74, та в літературі, цитованій у вказаній роботі; Sanmamed MF, et al., Annals of Oncology 2016; 27: 1190-1198, та в літературі, цитованій у вказаній роботі. Дослідження на основі LC/MS для визначення активності CD73 в сироватці людини

Свіжу нормальну людську кров центрифугують при 1500 g протягом 15 хв. при кімнатній температурі, і збирають верхню фракцію, яка містить сироватку. Зібрану сироватку (25 мкл/лунка) переносять на 96-лунковий планшет (DWP, Analytical Sales & Services Inc., № за каталогом 968820), що містить різні концентрації сполуки Прикладу 2 і фіксовану концентрацію левамізолу (1500 мкМ). Після інкубування на льоді протягом 60 хв. в кожен лунку планшету додають <sup>13</sup>C5-<sup>15</sup>N5-AMP (50 мкМ), і планшет інкубують при кімнатній температурі протягом 15 хв. Потім планшет поміщають на сухий лід з додаванням 200 мкл/лунку 17,3 ТСА з подальшим струшуванням при 26 струшуваннях/с протягом 3 хв. на машині для струшування планшетів (Qiagen). Потім планшет центрифугують при 2940 g протягом 20 хв. при температурі 4 °C. Після центрифугування 100 мкл/лунку супернатанту з кожної лунки переносять на новий 96-лунковий планшет з глибокими лунками, і змішують з 18,4 мкл/лунку 2,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> на льоді з подальшим додаванням 200 мкл екстракційного розчину, який містить внутрішній стандарт (IS (внутрішній стандарт): <sup>13</sup>C5-AMP, <sup>13</sup>C5-аденозин, <sup>13</sup>C5-гіпоксантин та <sup>15</sup>N4-інозин). Після подальшого центрифугування при 2940 g протягом 20 хв. при температурі 4 °C, 200 мкл/лунку супернатанту використовують для дослідження на <sup>13</sup>C10-<sup>15</sup>N5-аденозин, <sup>13</sup>C10-<sup>15</sup>N5-інозин та <sup>15</sup>N5-гіпоксантин із застосуванням LC/MS так, як описано вище. Для розрахунків EC<sub>50</sub>, концентрації інгібітора CD73 в сироватці крові коригують з незв'язаною фракцією (%), визначеною на in silico моделях або експериментально.

Таблиця 7 містить дані щодо інгібування активності CD73 в сироватці людини 5-[5-[(1S, 2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1 Н-піримідин-2,4-діоном (сполука Прикладу 2).

Таблиця 7

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

Таблиця 8 містить дані щодо інгібування активності CD73 в сироватці людини певними сполуками, розкритими у цьому описі.

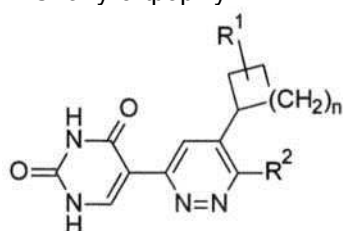
Таблиця 8

Приклад	EC <sub>50</sub> (мкМ)
1	0,1
2	0,213
3	0,051
8	0,179
9	0,297
10	0,055
22	0,212

5

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули



10

де

n становить 0-3;

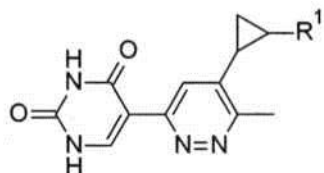
R¹ - це -H, -F, -гем-дифтор, -гем-диметил, -C₁-4алкіл, -CHF₂, -CF₂CH₃ або -CH₂CH₂F; та

R² вибраний з -H, -CH₃, -F, -Cl, -CN або -OCH₃;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

15

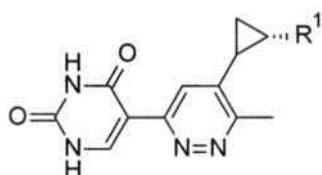
2. Сполука формули за п. 1, яка являє собою:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

20

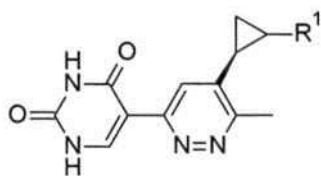
3. Сполука формули за п. 1 або 2, яка являє собою:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

25

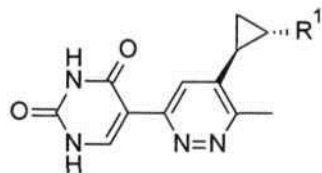
4. Сполука формули за п. 1 або 2, яка являє собою:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

5. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-4, яка являє собою:

5



або її фармацевтично прийнятна сіль.

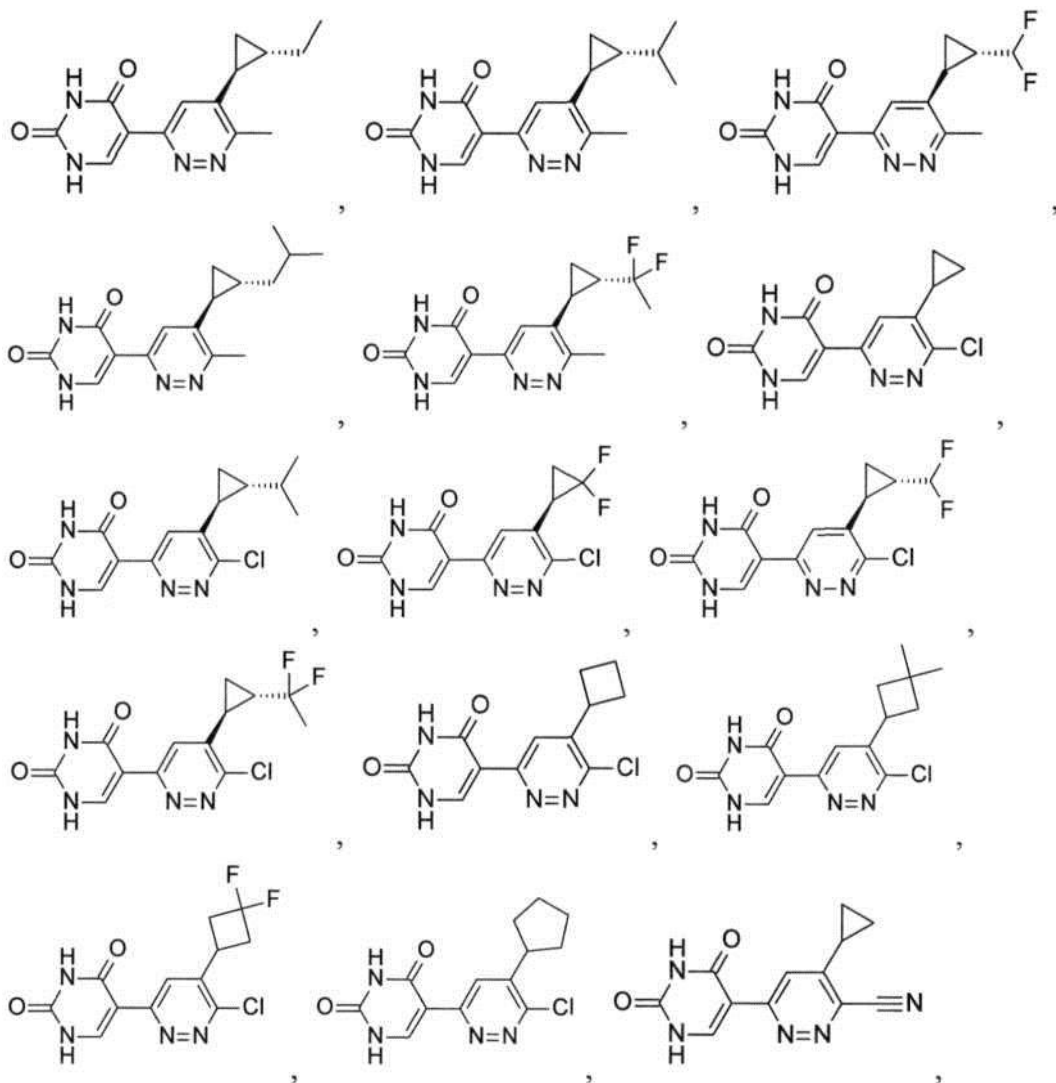
6. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-5, де n становить 0, R<sup>1</sup> - це -C<sub>1-4</sub>алкіл, і R<sup>2</sup> - це -CH<sub>3</sub>,

10

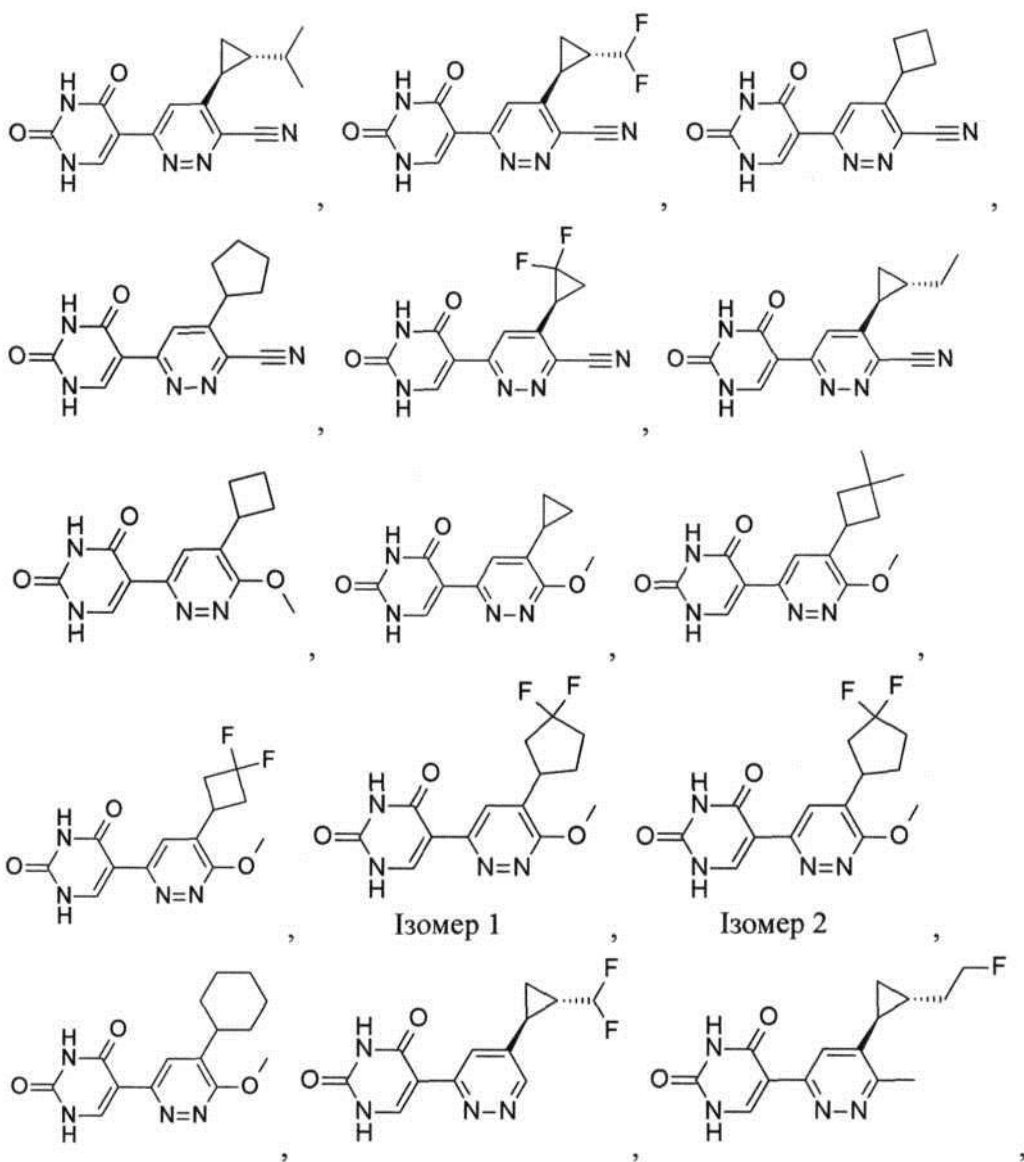
або її фармацевтично прийнятна сіль.

7. Сполука формули за п. 6, де R<sup>1</sup> - це ізопропіл, або її фармацевтично прийнятна сіль.

8. Сполука формули за п. 1, яка являє собою:



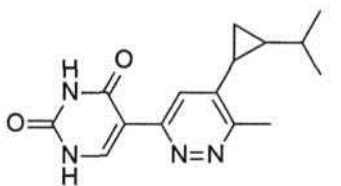
15



5

або її фармацевтично прийнятна сіль.

9. Сполука формули за будь-яким з пп. 1, 2, 6 та 7, яка являє собою:



10

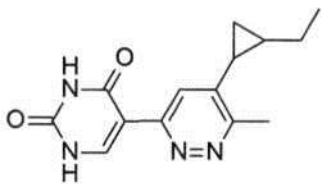
або її фармацевтично прийнятна сіль.

10. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-9, яка являє собою 5-[5-[(1S,2R)-2-ізопропілциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон, або її фармацевтично прийнятна сіль.

15

11. Сполука формули за будь-яким з пп. 1, 2, 6 та 7, яка являє собою:





або її фармацевтично прийнятна сіль.

12. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-8 або п. 11, яка являє собою 5-[5-[(1S,2S)-2-етилциклопропіл]-6-метилпіридазин-3-іл]-1H-піримідин-2,4-діон, або її фармацевтично прийнятна сіль.

13. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку формули за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятну сіль та один або декілька фармацевтично прийнятих носіїв, розріджувачів або наповнювачів.

14. Спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятної солі, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишок, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок.

15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що пацієнтом є той, у кого визначена активність CD73 у сироватці крові.

16. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що пацієнтом є той, у кого визначена тканинна експресія CD73.

17. Спосіб, який включає визначення активності CD73 в сироватці крові пацієнта, якому була введена сполука за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятна сіль.

18. Спосіб, який включає визначення експресії CD73 в тканині пацієнта, якому була введена сполука за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятна сіль.

19. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в терапії.

20. Сполука формули за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в лікуванні раку.

21. Сполука для застосування за п. 20, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишок, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок.

22. Застосування сполуки формули за будь-яким з пп. 1-12 або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.

23. Застосування за п. 22, де згаданий рак - це рак сечового міхура, рак молочної залози, холангіокарцинома, рак ободової і прямої кишок, рак ободової кишки, рак шлунка, рак жовчного міхура, гліобластома, рак голови та шиї, рак печінки, рак легенів, лімфома, медулобластома, меланома, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози або рак нирок.