

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043885

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.30

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290197

(22) Дата подачи заявки
2020.08.03

(54) СОЕДИНЕНИЯ 7,8-ДИГИДРО-4Н-ПИРАЗОЛО[4,3-с]АЗЕПИИ-6-ОНА

(31) 19382680.7

(56) WO-A1-2017205538
US-A1-2017333406

(32) 2019.08.05

(33) EP

(43) 2022.04.27

(86) PCT/US2020/044718

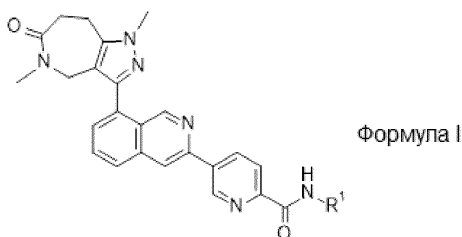
(87) WO 2021/026059 2021.02.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Лумерас Амадор Венсеслао,
Брандхубер Барбара Джин (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Христофоров А.А.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В. (RU)

(57) В данном изобретении раскрыты соединения формулы I:



где R¹ представляет собой CH₃ или CH₂CH₃; и их фармацевтически приемлемые соли, пригодные для лечения рака.

B1

043885

043885

B1

Данное изобретение относится к некоторым новым соединениям, которые представляют собой двойные ингибиторы бромодоменов CREBBP и EP300, к фармацевтическим композициям, содержащим соединения, к способам применения соединений для лечения определенных видов рака и к способам, пригодным для синтеза соединений.

Данное изобретение относится к области лечения рака. CREBBP и EP300 представляют собой гистонацетилтрансферазы (ГАТ) и действуют как коактиваторы для ряда факторов транскрипции. Сообщалось, что двойные ингибиторы бромодоменов CREBBP и EP300 опосредуют антипролиферативные ответы в линиях гематологических раковых клеток, таких как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) (см., например, T.D. Crawford, et al., J. Med.Chem., vol. 59, страницы 10549-10563 (2016)) и линий клеток множественной миеломы (см., например, A.R. Conery, eLIFE 2016;5:e10483). По-прежнему существует неудовлетворенная потребность в лечении рака, и требуются новые варианты лечения.

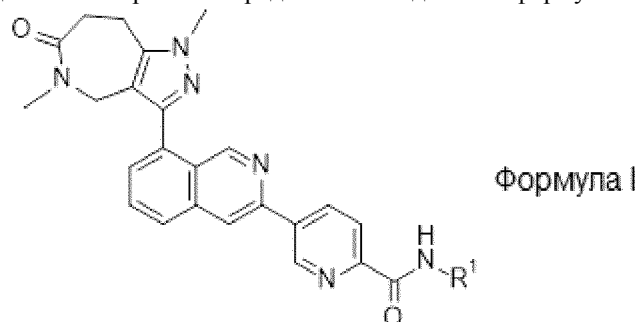
В WO 2017/205538 A1 описаны некоторые производные пиразолопиридина, которые представляют собой ингибиторы СВР и/или EP300 и пригодны для лечения различных нарушений, опосредованных СВР и/или EP300, таких как рак, воспалительные нарушения и аутоиммунные заболевания. В US 2017/0333406 A1 описаны некоторые производные пиразолопиридина, которые представляют собой ингибиторы СВР и/или EP300, пригодные в лечении нарушений, опосредованных СВР и/или EP300.

Необходимы дополнительные соединения двойных ингибиторов бромодоменов CREBBP и EP300. В данном изобретении предложены определенные соединения, которые ингибируют по меньшей мере один из бромодоменов CREBBP и EP300 и предпочтительно представляют собой двойные ингибиторы бромодоменов CREBBP и EP300. Кроме того, в данном изобретении предложены соединения, которые являются селективными двойными ингибиторами бромодоменов CREBBP и EP300 по сравнению с бромодомен-содержащим белком 4 ("BRD4").

В данном изобретении также предложены соединения, пригодные для лечения рака, такого как плоскоклеточный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ), фолликулярная лимфома, лимфома маргинальной зоны, уротелиальный рак верхних мочевыводящих путей, карцинома эндометрия, эндометриоидная карцинома матки, МРЛ, рак простаты и лимфома.

Кроме того, соединения по данному изобретению могут быть пригодны для лечения опухолей с мутациями CREBBP и/или EP300, таких как рак пищевода, рак легких, МРЛ, лимфома, рак мочевого пузыря, плоскоклеточная гистология, плоскоклеточный рак, включая рак анального канала, шейки матки, головы и шеи, легких и ротоглотки, эндометриоз матки и рак, вызванный ВПЧ. Соединения, раскрытые в данном документе, также могут быть пригодны для лечения состояний, связанных с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительных состояний, состояний, связанных со сверхэкспрессией тус, острого миелоидного лейкоза (включая слияния AML-ETO), острого лимфобластного лейкоза, множественных миелом и рака простаты. Плоскоклеточный рак включает рак анального канала, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак легких и рак ротоглотки.

Соответственно, в данном изобретении предложено соединение формулы I:



где R¹ представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; или его фармацевтически приемлемая соль.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Рак, который можно лечить, включает, но не ограничивается ими, плоскоклеточный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны, уротелиальный рак верхних мочевыводящих путей, карциному эндометрия, эндометриоидную карциному матки, МРЛ, рак простаты, лимфому, рак пищевода, рак легких, рак мочевого пузыря, плоскоклеточную гистологию, эндометриоз матки, рак, вызванный ВПЧ, состояния, связанные с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительные состояния, состояния, связанные со сверхэкспрессией тус, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественные миеломы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, и рак простаты.

В данном изобретении предложен способ лечения мелкоклеточного рака легких (МРЛ) у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения

формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В данном изобретении также предложен способ лечения лимфомы у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В данном изобретении также предложен способ лечения плоскоклеточного рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. See Vettore, AL., Ramnarayanan, K., Poore, G. et al. Mutational landscapes of tongue carcinoma reveal recurrent mutations in genes of therapeutic and prognostic relevance. *Genome Med.* 7 (1) 98 (2015) (отмечаются изменения гена CREBBP в плоскоклеточном раке ротовой полости); см. также Martin D, Abba MC, Molinolo AA, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget.* 5 (19):8906-8923. (2014) (отмечаются изменения генов CREBBP и EP300 в плоскоклеточном раке головы и шеи). В данном изобретении предложен также способ лечения рака, вызванного вирусом папилломы человека, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В данном изобретении также предложен способ лечения опухолей с мутациями CREBBP и/или EP300 у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения уротелиального рака мочевого пузыря у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Gui, Y., Guo, G., Huang, Y. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature Genetics* 43 (9), 875-8 (2011) (отмечаются генетические aberrации CREBBP и EP300 у пациентов с раком мочевого пузыря)). В данном изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения рака толстой кишки у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Bryan, EJ., Jokubaitis, VJ., Chamberlain, NL., et al. Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 102(2):137-141 (2002) (отмечаются генетические мутации EP300 при раке толстой кишки, молочной железы и яичников человека)). Кроме того, раскрыт способ лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Morin, RD., Mendez-Lago, M., Mungall, AJ. et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 476 (7360) 298-303 (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 при неходжкинской лимфоме). Раскрыт способ лечения фолликулярной лимфомы у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Okosun J, Bödör C, Wang J, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nature Genetics* 46 (2) 176-181 (2014) (отмечаются генетические мутации CREBBP при фолликулярной лимфоме)). Раскрыт способ лечения лимфомы маргинальной зоны у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Jung, H., Yoo, HY., Lee, SH, et al. The mutational landscape of ocular marginal zone lymphoma identifies frequent alterations in TNFAIP3 followed by mutations in TBL1XR1 and CREBBP. *Oncotarget* 8 (10) 17038-17049 (2017) (отмечаются генетические мутации CREBBP при лимфоме маргинальной зоны)). Раскрыт способ лечения уротелиального рака верхних мочевыводящих путей у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Grivas, P., Mortazavi, A., Picus, J. et al. Mocetinostat for patients with previously treated, locally advanced/metastatic urothelial carcinoma and inactivating alterations of acetyltransferase genes. *Cancer.* 125 (4) 533-540. (2019) (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 при запущенной/метастатической уротелиальной карциноме)). Раскрыт способ лечения карциномы эндометрия у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения эндометриодной карциномы матки у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения МРЛ у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения рака простаты у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Liu, J., He, D., Cheng, L. et al. p300/CBP inhibition enhances the efficacy of programmed death-ligand 1 blockade treatment in prostate cancer. *Oncogen* 39, 3939-3951 (2020) (отмечается эффект ингибиторов CREBBP и EP300 при лечении рака простаты)).

Также раскрыт способ лечения опухолей с мутациями CREBBP и/или EP300, таких как рак пищево-

да, рак легких, МРЛ, лимфома, рак мочевого пузыря и плоскоклеточная гистология у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения плоскоклеточного рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Morris, V., Rao, X., Pickering, C. et al. *Comprehensive Genomic Profiling of Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal*. *Molecular Cancer Research* 15 (11), 1542-1550 (2017) (отмечаются генетические мутации EP300 в плоскоклеточной карциноме анального канала); Vettore, AL., Ramnarayanan, K., Poore, G. et al. *Mutational landscapes of tongue carcinoma reveal recurrent mutations in genes of therapeutic and prognostic relevance*. *Genome Med.* 7 (1) 98 (2015) (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 при карциноме тела языка); и Martin D, Abba MC, Molinolo AA, et al. *The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies*. *Oncotarget.* 5 (19):8906-8923. (2014) (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 при плоскоклеточном раке головы и шеи)). Также раскрыт способ лечения эндометриоза матки у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения рака, вызванного ВПЧ, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Раскрыт способ лечения состояний, связанных с транслокацией AML-ETO, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S. et al. *E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein*. *Science.* 305 (5688) 1286-1289 (2004) (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 в случаях острого миелоидного лейкоза)). Раскрыт способ лечения андроген-рецептор-положительных состояний у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Garcia-Carpizo, V., Ruiz-Llorente, S., Sarmentero, J. et al. *CREBBP/EP300 Bromodomain Inhibition Affects the Proliferation of AR-Positive Breast Cancer Cell Lines*. *Molecular Cancer Research* 17 (3), 720-730 (2019) (отмечается влияние ингибиторов CREBBP и EP300 на андроген-рецептор-положительные клеточные линии рака молочной железы); см. также Aarnisalo, P., Palvimo, JJ. & Jänne, OA. et al. *CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling*. *PNAS* 95 (5), 2122-2127 (1998) (отмечается присутствие CREBBP в андроген-зависимых сигнальных путях)). Раскрыт способ лечения состояний, связанных со сверхэкспрессией мус, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

Раскрыт способ лечения острого миелоидного лейкоза, включая слияния AML-ETO, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Brooks et al, *CCS 1477: A Novel Small Molecule Inhibitor of p300/CBP Bromodomain for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma*. *Blood* (2019) 134 (Supplement 1): 2560) (отмечается влияние ингибиторов CREBBP и EP300 при лечении ОМЛ)). Раскрыт способ лечения острого лимфобластного лейкоза у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Zhang, H., Kham, SK. et al. *Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP*. *Genome Research* (2017) 27 185-195) (отмечаются генетические мутации CREBBP и EP300 при остром лимфобластном лейкозе). Также раскрыт способ лечения множественных миелом у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Brooks et al, *CCS 1477: A Novel Small Molecule Inhibitor of p300/CBP Bromodomain for the Treatment of Acute Myeloid Leukaemia and Multiple Myeloma*. *Blood* (2019) 134 (Supplement 1): 2560). Раскрыт способ лечения рака простаты у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли (см. Liu, J., He, D., Cheng, L. et al. *p300/CBP inhibition enhances the efficacy of programmed death-ligand 1 blockade treatment in prostate cancer*. *Oncogen* 39, 3939-3951 (2020) (отмечается влияние ингибиторов CREBBP и EP300 при лечении рака простаты)). Кроме того, в данном изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. Кроме того, в данном изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении рака. Рак, который можно лечить, включает плоскоклеточный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны, уротелиальный рак верхних мочевыводящих путей, карциному эндометрия, эндометриодную карциному матки, МРЛ, рак простаты, лимфому, рак пищевода, рак легких, рак мочевого пузыря, плоскоклеточную гистологию, эндометриоз матки, рак, вызванный ВПЧ, состояния, связанные с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительные состояния, состояния, связанные со сверхэкспрессией мус, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественные миеломы, рак, вызванный вирусом папилломы человека, и рак простаты.

связанных с транслокацией AML-ETO. В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения андроген-рецептор-положительных состояний. В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения состояний, связанных со сверхэкспрессией тус. В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения острого миелоидного лейкоза (включая слияния AML-ETO). В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения острого лимфобластного лейкоза. В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения лимфомы множественных миелом. В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения рака простаты.

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В данном изобретении дополнительно предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Данное изобретение также охватывает новейшие промежуточные соединения и способы синтеза соединений формулы I.

Используемые в данном документе термины "лечащий", "лечение" или "лечить" включает ограничение, замедление, остановку или обратное развитие прогресса или тяжести существующего симптома или расстройства.

Используемый в данном документе термин "пациент" относится к млекопитающему, в частности, человеку.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

Эффективное количество может установить специалист в данной области техники, используя известные методики и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного для пациента количества наблюдающий врач-диагностик учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: биологический вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень вовлеченности или тяжесть заболевания или расстройства; реакцию отдельного пациента; конкретное введенное соединение; способ введения; характеристики биодоступности введенного препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие релевантные обстоятельства.

Соединения по данному изобретению составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения. Наиболее предпочтительно, такие композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Определенные промежуточные соединения, описанные в последующих примерах получения, могут содержать одну или более азотных защитных групп. Используемый в данном документе термин "PG" относится к подходящей защитной группе. Следует понимать, что защитные группы могут быть различными, что известно специалистам в данной области техники, в зависимости от конкретных условий реакций и конкретных проводимых превращений. Условия постановки защиты и снятия защиты хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в литературных источниках (см., например, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

В одном аспекте описанные в данном документе соединения и/или соли являются кристаллическими. В одном варианте реализации изобретения раскрытые в данном документе соединения представляют собой свободные амины. В другом аспекте свободный амин является кристаллическим. В альтернативном варианте, свободный амин может быть превращен в фармацевтически приемлемую соль, как описано ниже.

В одном аспекте описанные в данном документе соединения и/или соли вводятся в комбинации с одним или более другими лекарственными средствами. Описанные в данном документе соединения и/или соли и одно или более других лекарственных средств могут вводиться одновременно или в течение часа или около того друг от друга. Неограничивающие примеры других лекарственных средств для комбинации с описанными в данном документе соединениями и/или солями включают другие противораковые лекарственные средства, стероиды и противовоспалительные средства. Неограничивающие примеры других противораковых лекарственных средств включают даролутамид, энзалутамид, абемациклиб, аль-

пелисиб и ингибиторы BRD4. Неограничивающие примеры ингибиторов BRD4 включают CPI-0610, PLX51107, GSK2820151 (I-BET151), OTX015 (МК-8628), ABBV-075, FT-1101, GSK525762 (I-BET762), ZEN003694 и ABBV-744. В одном варианте реализации изобретения соединения и/или соли, описанные в данном документе, и одно или более других лекарственных средств составлены в виде единой лекарственной формы. В другом варианте реализации изобретения они составлены отдельно.

Фармацевтически приемлемая соль соединений по изобретению может образовываться, например, с помощью реакции между подходящим свободным основанием соединения по изобретению и подходящей фармацевтически приемлемой кислотой, в подходящем растворителе, при стандартных условиях, известных в данной области техники. В альтернативном варианте, образование таких фармацевтически приемлемых солей может происходить одновременно со снятием азотных защитных групп. См., например, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); и Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977).

Некоторые сокращения определены следующим образом: "АЦН" относится к ацетонитрилу; "АР" относится к андрогеновому рецептору; "водный" относится к водному; "бис(пинаколато)диборон" относится к бис(пинаколато)диборану или 4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3,2-диоксаборолану; "цАМФ" относится к циклическому аденозинмонофосфату; "cataCXium® A Pd G3" относится к мезилату [(ди(1-адамантил)-н-бутилфосфин)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия (II) или [(ди(1-адамантил)-бутилфосфин)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]метансульфонату палладия (II); "ССБ", "СРЕВ-связывающий белок" и "СРЕВСЕ" могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к связывающему белку белка, связывающего элемент ответа цАМФ; "КДИ" относится к 1,1'-карбонилдидиимдазолу; "ЦПМЭ" относится к циклопентилметилового эфиру; "ДЦГ" относится к 1,3-дициклогексилкарбодиимиду; "ДХМ" относится к дихлорметану или метиленхлориду; "ДИК" относится к 1,3-диизопропилкарбодиимиду; "ДИПЭА" относится к N,N-диизопропилэтиламину или N-этил-N-изопропилпропан-2-амину; "ДМАП" относится к 4-диметиламинопиридину; "ДМФ" относится к N,N-диметилформамиду; "ДМИС" относится к среде Игла, модифицированной Дульбекко; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "ДНК" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; "EDCI" относится к гидрохлориду 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этиловому спирту или этанолу; "ФБС" относится к фетальной бычьей сыворотке; "НАТУ" относится к гексафторфосфату 1-[бис(диметиламино)метилен]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний-3-оксида; "НВТУ" относится к гексафторфосфату 3-[бис(диметиламино)метилимил]-3Н-бензотриазол-1-оксида; "ПЭЧ" относится к почке эмбриона человека; "НОАт" относится к 1-гидрокси-7-азобензотриазолу; "НОВт" относится к гидрату 1-гидроксилбензотриазола; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "iPrOH" относится к изопропанолу или изопропиловому спирту; "КОАс" относится к ацетату калия; "МНС" относится к минимальной необходимой среде; "MeOH" относится к метанолу или метиловому спирту; "МТБЭ" относится к метил-трет-бутиловому эфиру;

"ОНf" относится к наофлату или $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_3^-$; "ФСБ" относится к фосфатно-солевому буферу; "Pd₂(dba)₃" относится к трис(добензилиденацетон)дипалладию (0); "Pd(dppf)Cl₂" относится к [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладию (II);

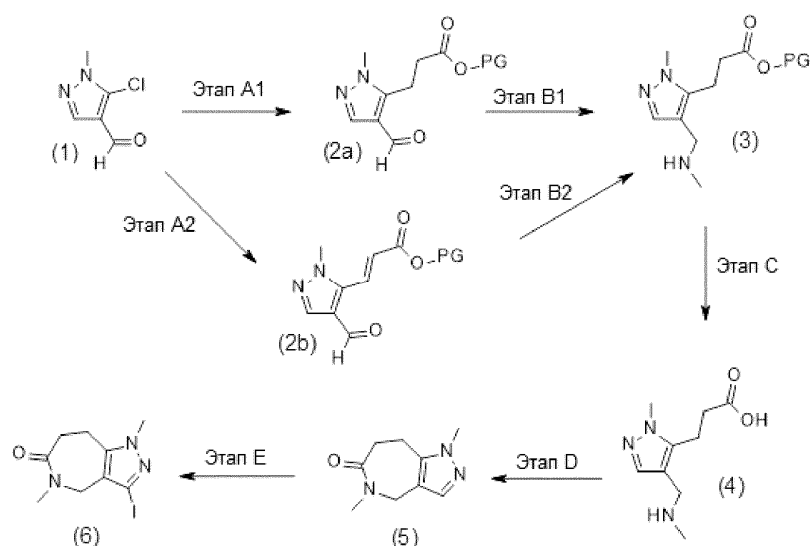
"Pd(dppf)Cl₂-ДХМ" относится к [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладиевому комплексу дихлорметана;

"катализатор Перлмана" относится к гидроксиду палладия на угле или Pd(OH)₂/C; "фунты/кв. дюйм" относится к фунтам на квадратный дюйм; "РуВОР" относится к (бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфоний гексафторфосфату); "РуВrОР" относится к бром(трипирролидинил)фосфония гексафторфосфату; "об/мин" относится к обороту в минуту; "КТ" относится к комнатной температуре; "СКХ" относится к хроматографии с сильным катионообменом; "ТЗР" относится к 2,4,6-три-*n*-пропил-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфоринан-2,4,6-триоксиду или *n*-пропилфосфоновому ангидриду; "ТФК" относится к трифторуксусной кислоте; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; "Xantphos" относится к 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантену; "XantPhos-Pd-G2" относится к хлор[(4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладию (II); "XPhos" относится к 2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенилу; и "XPhos Pd G2" относится к хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладию (II).

Соединения по данному изобретению или их фармацевтически приемлемые соли получают с помощью множества методик, известных рядовым специалистам в данной области техники, некоторые из которых представлены ниже на схемах, в примерах получения и примерах. Продукты каждого этапа на приведенных ниже схемах могут быть выделены традиционными методами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, упаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На следующих схемах все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества общедоступны рядовым специалистам в данной области техники. Не ограничивая объем изобретения, следующие схемы, примеры получения и

примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения.

Схема 1.



На схеме 1 изображено образование пиразоло[4,3-с]азепин-6-она - соединения (6). На схеме 1, этапе A1, замещенный 5-хлор-4-карбальдегид пиразол (1) сочетают с калий-трифторбор-пропил-трет-бутоксигруппой в условиях палладиевого сочетания Сузуки с использованием основания, такого как карбонат цезия, в растворителе, таком как 1,4-диоксан и вода, и катализатора, такого как XPhos Pd G2, и нагревают до около 110°C с получением соединения (2a). Реакции палладиевого кросс-сочетания хорошо известны в данной области, и квалифицированный специалист поймет, что существует множество условий, полезных для облегчения таких реакций кросс-сочетания. Подходящие палладиевые катализаторы включают XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, бис(трифенилфосфин)палладия (II) хлорид, Pd(dppf)Cl₂, Pd₂dba₃, тетракистрифенилфосфин палладия и ацетат палладия (II). Подходящие лиганды, если необходимо, могут включать трициклогексилфосфин и трифенилфосфин. Подходящие основания включают фторид калия, карбонат цезия, карбонат натрия, карбонат калия, трет-бутоксид натрия и моногидрат трехосновного фосфата калия.

На схеме 1, этапе B1, соединение (2a) может подвергаться восстановительному аминированию с получением метиламиносоединения (3). Восстановительное аминирование может быть выполнено с использованием условий, хорошо известных в данной области техники, таких как добавление метиламина к раствору соединения (2a) в ДХМ или раствору MeOH с каталитическим количеством кислоты, такой как уксусная кислота, и перемешивание в течение подходящего времени, например, около 1 часа. Затем добавляют подходящий восстанавливающий агент, такой как триацетоксиборгидрид натрия. Могут быть использованы другие восстанавливающие агенты, известные в данной области, такие как NaBH₄ или LiBH₄, для получения метиламиносоединения (3).

На схеме 1, этапе C, с метиламиносоединения (3) может быть снята защита в кислых условиях, хорошо известных в данной области техники, таких как использование ТФК или соляной кислоты, при комнатной температуре для получения карбоновой кислоты (4). "PG" означает защитную группу, разработанную для карбоновых кислот. Такие защитные группы хорошо известны и изучены в данной области техники. Карбоновую кислоту (4) затем можно циклизировать с помощью реагента амидного сочетания с получением соединения (5). Внутренняя амидная циклизация может осуществляться в полярном апротонном растворителе, таком как ДМФ, при КТ с основанием, таким как ДИПЭА и реагентом сочетания, таким как ТЗР. Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует ряд способов и реагентов для получения амида в результате взаимодействия карбоновых кислот с аминами. Например, взаимодействие амина с соответствующей карбоновой кислотой в присутствии реагента сочетания с или без органического основания, такого как ДИПЭА или триэтиламин, может дать соединение 5. Реагенты сочетания включают карбодиимиды, такие как ДЦК, ДИК, EDCI или карбонилдиимидазол, такой как КДИ. Для ускорения реакции также могут использоваться добавки для амидного сочетания, такие как НОВт и НОАт. Кроме того, вместо более традиционных реагентов сочетания могут применяться соли урония или фосфония с нуклеофильными анионами, такие как НВТУ, НАТУ, РуВОР и РуВгОР. Для ускорения реакции может использоваться добавка, такая как ДМАП. В альтернативном варианте неочищенный раствор соединения 3 в EtOH может быть обработан 2,2,2-трифторэтанолом в непрерывной реакционной системе для снятия защиты и циклизации *in situ*, и после концентрирования получают соединение (5).

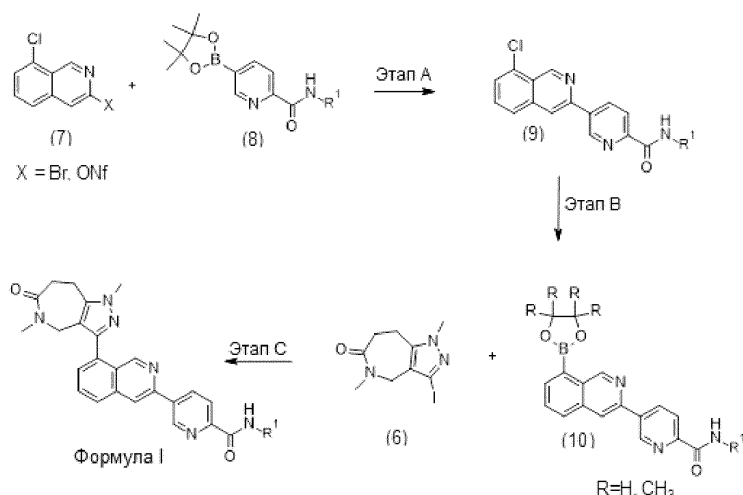
Затем соединение (5) может быть йодировано на пиразоле с использованием йода и сульфата серебра в растворителе, таком как EtOH, с получением соединения (6). Специалисты в данной области поймут, что другие галогены, такие как бром и хлор, могут быть замещены вместо йода для получения подходя-

шего соответствующего галогенированного соединения (6), т.е. йод также может представлять собой бром или хлор, давая подходящее промежуточное соединение для использования в схеме 2 ниже.

Следуя альтернативным этапам реакции на схеме 1, на этапе A2 соединение (1) может быть обработано трет-бутилакрилатом в условиях реакции Хека с образованием замещенного алкенового соединения (2b) с использованием основания, такого как N,N-дициклогексилметиламин, в растворителе, таком как 1,4-диоксан, и подходящего палладиевого катализатора, такого как хлор[(три-трет-бутилфосфин)-2-(2-аминобифенил)] палладий (II)]. Типичные катализаторы, используемые в реакциях Хека, представляют собой тетраakis(трифенилфосфин) палладия (0), хлорид палладия и ацетат палладия (II). Типичные лиганды представляют собой трифенилфосфин, три-трет-бутилфосфин, Xantphos, XPhos и бис(ди-трет-бутилфосфино)ферроцен.

На схеме 1, этапе B2, соединение (2b) затем может быть преобразовано в соединение (3) в общей двухэтапной реакции. Метиламин может быть добавлен к соединению (2b) в растворителе, таком как EtOH, и перемешан в течение около 90 минут для осуществления образования имина. Затем алкен и имин могут быть восстановлены в условиях гидрирования с использованием подходящего катализатора, такого как катализатор Перлмана, и гидрогенизированы с получением соединения (3).

Схема 2.



На схеме 2, этапе А, соединение (9) может быть получено сочетанием боронового эфира соединения (8) с 3-бром-8-хлоризохинолином - соединением (7) - (X=Br, ONf), в условиях кросс-сочетания Сузуки, аналогичных условиям, описанным для соединения 2a на схеме 1, этапе A1. Например, соединения (7) объединяют с соединением (8) и обрабатывают основанием, таким как карбонат натрия или карбонат калия в растворителях, таких как 1,4-диоксан и вода, в атмосфере азота с использованием катализатора, такого как Pd(dppf)Cl₂·ДХМ, и нагревают до около 80-95°C для получения соединения (9). В альтернативном варианте соединение 8 может быть получено in situ из 5-бром-N-метилпиридин-2-карбоксамид, бис(пинаколато)диборола и КОАс в ЦПМЭ с использованием Pd(dppf)Cl₂ при 60-95°C. После соответствующего времени взаимодействия, составляющего около 4-8 часов, смесь охлаждают, и соединение (9) получают, как описано выше, с сохранением в качестве растворителя ЦПМЭ и с использованием Pd(dppf)Cl₂ в качестве катализатора. На схеме 2, этапе В, хлорид соединения (9) может быть заменен бис(пинаколато)дибороном (для R=CH₃) или тетрагидроксидибороном (для R=H) в условиях борилирования Мияуры для получения соединения (10). Например, КОАс может использоваться в качестве основания, XPhos может использоваться в качестве лиганда, а XPhos Pd G2 может использоваться в качестве катализатора в растворителе, таком как 1,4-диоксан для (R=CH₃), этиленгликоль и MeOH (для R=H). Затем реакционную смесь нагревают до около 40°C (для R=H) и до около 90°C для (R=CH₃) для получения соединения (10). Другими катализаторами, которые могут быть использованы, являются ацетат палладия (II) или Pd₂(dba)₃, а другие растворители могут представлять собой толуол или 2-метил-2-бутанол.

На схеме 2, этапе С, соединение (10) может затем сочетаться с соединением (6) в стандартных условиях палладиевого кросс-сочетания, как описано на схеме 1, этапе A1. Например, использование подходящего растворителя, такого как 1,4-диоксан или EtOH, подходящего основания, такого как фосфат калия, и соответствующего катализатора, такого как Pd(dppf)Cl₂·ДХМ или Pd₂(dba)₃, с трициклогексилфосфином в качестве лиганда, если необходимо, и нагревание до около 50-95°C дает соединения формулы I.

Следующие примеры получения и примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение.

Пример получения 1: трет-бутил-3-(4-формил-2-метилпиразол-3-ил)пропаноат.

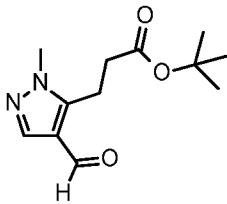


Схема 1, этап А1: суспензию 5-хлор-1-метил-7Н-пиразол-4-карбальдегида (17,8 г, 119 ммоль) и калия (3-трет-бутокси-3-оксипропил)трифторборануида (38,0 г, 161 ммоль) в 1,4-диоксане (298 мл) обрабатывают раствором карбоната цезия (117 г, 358 ммоль) в воде (60 мл) и продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют XPhos Pd G2 (9,4 г, 11,9 ммоль), и реакционную смесь снова продувают в течение 10 мин и греют при 110°C в атмосфере азота в течение 20 ч. Охлажденную реакционную смесь фильтруют через слой диатомовой земли, промывают EtOAc (900 мл), ДХМ (200 мл) и концентрируют в вакууме. Полученное маслянистое вещество растворяют в EtOAc (1,2 л), промывают 1 М водн. NaOH (3×200 мл) и рассолом (200 мл). Органическую фазу сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают досуха. Неочищенный материал очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом от 0-50% гексанов до EtOAc, для получения указанного в заголовке соединения (15,7 г, 53 %) в виде маслянистого вещества светло-желтого цвета. ЭР/МС (m/z): 239 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO) δ 9,80 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,13 (t, J= 7,5 Гц, 2H), 2,58 (t, J= 7,5 Гц, 2H), 1,36 (s, 9H).

Пример получения 2: трет-бутил-(E)-3-(4-формил-2-метилпиразол-3-ил)проп-2-еноат.

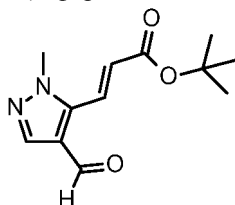


Схема 1, этап А2: 5-хлор-1-метил-7Н-пиразол-4-карбальдегид (50,0 г, 329 ммоль), трет-бутилакрилат (70 мл, 468 ммоль) и N,N-дициклогексилметиламин (140 мл, 650 ммоль) растворяют в 1,4-диоксане (400 мл). Смесь продувают азотом в течение 15 минут, затем добавляют хлор[(три-трет-бутилфосфин)-2-(2-аминобифенил)]палладий (II) (3,46 г, 6,62 ммоль), снова продувают азотом, и реакционную смесь перемешивают при 85°C (внутренняя температура) в течение 16 ч, затем при 99°C (внутренняя температура) в течение еще 3 ч. Нагревание прекращают, и когда внутренняя температура опускается ниже 60°C, смесь разбавляют водой (300 мл) и EtOAc (500 мл). Фазы разделяют, и водн. фазу снова разбавляют водой (500 мл), после чего образуется дополнительная органическая фаза. Фазы разделяют, и водн. фазу экстрагируют EtOAc (250 мл). Объединенные органические фазы встряхивают с 10% водн. лимонной кислотой (500 мл), фильтруют через диатомовую землю и промывают водой (0,1 л) и EtOAc (250 мл). Органический слой сушат над MgSO₄, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении при 50°C для получения густого маслянистого вещества красно-оранжевого цвета (92 г). К смеси добавляют гептан (500 мл) при 50°C, затем перемешивают в течение ночи при КТ, в это время исходное маслянистое вещество превращается в твердое вещество. Полученное твердое вещество собирают фильтрацией и промывают 10% EtOAc/гептаном (50 мл), а затем гептаном (100 мл). Твердое вещество сушат в вакуумной печи (40°C, 10 мБар) в течение 22 часов для получения указанного в заголовке соединения (57,1 г, 73 %) в виде твердого вещества кремового цвета. ЭР/МС (m/z): 237 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, CDCl₃) δ 9,96 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,64 (d, J=16,1 Гц, 1H), 7,02 (d, J=16,1 Гц, 1H), 4,02 (s, 3H), 1,57 (s, 9H).

Пример получения 3: трет-бутил-3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропаноат.

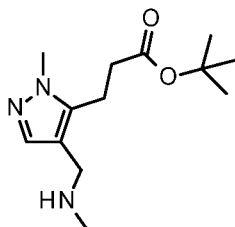


Схема 1, этап В1: 2 М метанамин в ТГФ (10,2 мл, 20,4 ммоль) добавляют к раствору трет-бутил-3-(4-формил-2-метилпиразол-3-ил)пропаноата (0,81 г, 3,4 ммоль) и уксусной кислоты (0,2 мл, 3,4 ммоль) в ДХМ (17 мл). Смесь перемешивают при КТ в течение 1 ч. Добавляют триацетоксиборгидрид натрия (2,88 г, 13,6 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 17 ч. Реакционную смесь разбавляют насыщенным водн. NaHCO₃ (30 мл) и ДХМ (30 мл). Водн. фазу экстрагируют ДХМ (4×100 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают досуха для

получения маслянистого вещества коричневого цвета. Неочищенный материал очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом от 0-70% ДХМ до ДХМ/7 Н NH₃ в MeOH (9:1) для получения указанного в заголовке соединения (0,64 г, 73%) в виде маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 254 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO) δ 7,22 (s, 1H), 3,72 (s, 1H), 3,42 (s, 2H), 2,85 (t, J= 7,7 Гц, 2H), 2,47 (t, J= 7,7 Гц, 2H), 2,24 (s, 3H), 1,38 (s, 9H).

Альтернативный пример получения 3

Трет-бутил-3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропаноат Схема 1, этап В2: Метиламин (33 % в EtOH, 85 мл, 683 ммоль) добавляют к раствору трет-бутил-(Е)-3-(4-формил-2-метилпиразол-3-ил)проп-2-еноата (57,1 г, 239 ммоль) в EtOH (180 мл) и перемешивают при КТ в течение 90 мин. Суспензию влажного катализатора Перлмана (20% мас. по сухому веществу, 2,5 г, 18 ммоль) в EtOH (60 мл) загружают в сосуд автоклава из нержавеющей стали 316 SS при продувке азотом. Добавляют первоначально приготовленный раствор имина и промывают EtOH (60 мл). Автоклав устанавливают, и сосуд закрывают, продувают и заполняют водородом до давления 110 фунтов/кв. дюйм (7,1 Бар), затем перемешивают при КТ в течение 20 ч (без дальнейшего потребления водорода через около 14 ч). Смесь фильтруют через слой диатомовой земли и промывают EtOH. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении до объема около 200 мл. ЭР/МС и ¹H-ЯМР раствора соответствуют ожидаемому соединению. Раствор EtOH используют без выделения и дополнительной очистки указанного в заголовке соединения, предполагая количественный выход (65,9 г, 239 ммоль).

Пример получения 4: 3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропановая кислота.

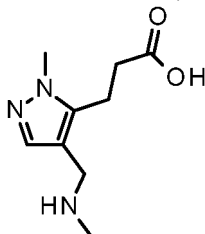


Схема 1, этап С. К раствору трет-бутил-3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропаноата (9,6 г, 37,5 ммоль) в ДХМ (150 мл) добавляют ТФК (43 мл, 562 ммоль), и смесь перемешивают при КТ в течение 2 часов. Раствор концентрируют при пониженном давлении и следовые количества ТФК совместно упаривают с АЦН для получения бесцветного маслянистого вещества, которое используют на следующем этапе без дополнительной очистки, предполагая количественный выход (7,54 г, 37,5 ммоль). ЭР/МС (m/z): 198 (M+H).

Пример получения 5: 1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-он.

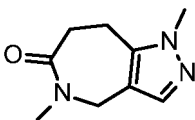


Схема 1, этап D: 3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропановую кислоту (7,54 г, 37,5 ммоль) растворяют в DMF (375 мл) и обрабатывают ДИПЭА (24,2 г, 187 ммоль), по каплям добавляют ТЗР (50 % в DMF) (43,8 мл, 75,0 ммоль) и перемешивают при КТ в течение 5 часов. Реакционную смесь разбавляют водой (800 мл), и pH доводят до 8 с помощью нас. водн. NaHCO₃. Раствор экстрагируют ДХМ/iPrOH (8:2) (8×250 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают досуха. Остаток очищают с помощью СКХ-хроматографии при следующих условиях: колонку уравнивают 2 объемами MeOH, соединение растворяют в MeOH (5+5 мл), добавляют в колонку, промывают MeOH (6 объемов) и элюируют 7 Н NH₃ в MeOH (250 мл). Основную фракцию упаривают для получения указанного в заголовке соединения (5,56 г, 83%) в виде беловатого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 180 (M+H). ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO): δ 7,23 (s, 1H), 4,34 (s, 2H), 3,65 (s, 3H), 2,86 (s, 3H), 2,85-2,77 (m, 4H).

Альтернативный пример получения 5: 1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-он.

Схема 1, этап D: Раствор трет-бутил-3-[2-метил-4-(метиламинометил)пиразол-3-ил]пропаноата в EtOH из альтернативного примера получения 3 (около 239 ммоль) фильтруют через полипропиленовую мембрану толщиной 0,45 мкм. Объем доводят до 0,3 л, используя EtOH, и добавляют 2,2,2-трифторэтанол (750 мл) для получения исходного раствора. Трубочатый реактор из нержавеющей стали 316-SS объемом 60 мл (наружный диаметр 1/8 дюйма) с регулятором противодействия 4000 кПа промывают смесью 2,2,2-трифторэтанола и EtOH (промывочный растворитель) в соотношении 3:1. Реактор нагревают до 220°C и исходный раствор прокачивают через реактор со скоростью 3 мл/мин (время пребывания 20 мин) с использованием химически стойкого насоса ВЭЖХ. После того, как весь раствор будет закачан в реактор, реактор промывают смесью 2,2,2-трифторэтанола и EtOH 3:1 (около 100 мл) при той же скорости потока. Выходной раствор и промывочный раствор концентрируют при пониженном давлении при 50°C для получения указанного в заголовке неочищенного соединения (48,38 г, чистота по ЖХМС

89%, около 20 % мас. растворителя по данным ^1H -ЯМР, 186,3 ммоль). ЭР/МС (m/z): 180 (M+H).

Пример получения 6: 3-йод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-он.

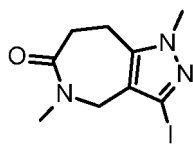
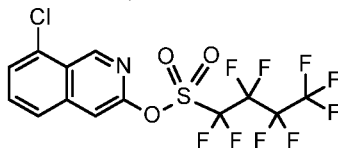


Схема 1, этап Е: К раствору 1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-она (5 г, 26,6 ммоль) в EtOH (60 мл) добавляют йод (распыленный, 10 г, 39,4 ммоль), а затем сульфат серебра (15,2 г, 48,7 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 48 ч. Добавляют ДХМ (500 мл), и суспензию перемешивают в течение 2 ч, жидкость отцеживают, твердое вещество растирают с 20% iPrOH в ДХМ (600 мл) и перемешивают в течение 4 часов. Смесь фильтруют, твердое вещество отбрасывают и фильтрат концентрируют в вакууме. Добавляют водн. NH_3 (32%, 150 мл) и раствор экстрагируют ДХМ (2×350 мл). Объединенные органические экстракты промывают нас. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют в вакууме для получения твердого вещества. Твердое вещество растирают в смеси гексанов:МТБЭ (1:1) (90 мл) в течение 2 ч. Твердые вещества фильтруют и сушат в сушильном шкафу под вакуумом в течение 16 ч при 45°C для получения твердого вещества (7,36 г, 89%) в виде твердого вещества белого цвета. ЭР/МС (m/z): 306 (M+H), ^1H -ЯМР (400,21 МГц, d_6 -ДМСО) δ 4,20 (s, 2H), 3,68 (s, 3H), 2,87 (s, 3H), 2,86-2,80 (m, 4H).

Альтернативный пример получения 6: 3-йод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-он.

Схема 1, этап Е. Раствор 1,5-диметил-7,8-дигидропиразоло[4,3-с]азепин-6-она (31,6 г, чистота по ЖХМС 94%, 166 ммоль) в EtOH (250 мл) добавляют к сульфату серебра (62,3 г, 200 ммоль). Раствор перемешивают в атмосфере азота. Раствор монохлорида йода в ДХМ (1,0 М, 220 мл, 220 ммоль) добавляют четырьмя приблизительно равными порциями с 15-минутными интервалами. Для уменьшения экзотермического эффекта используется внешняя водяная баня. После перемешивания в течение 23 ч добавляют дополнительную порцию монохлорида йода в ДХМ (1,0 М, 33 мл, 33 ммоль). После перемешивания в течение дополнительных 73,5 ч смесь фильтруют через диатомитовую землю, и осадок на фильтре промывают ДХМ (300 мл). Фильтрат и промывочный раствор перемешивают со смесью 20% водн. NaHSO_3 и нас. водн. NaCl (400 мл) в течение 1,5 ч, затем фильтруют через диатомитовую землю, и осадок на фильтре промывают ДХМ (200 мл). Фазы фильтрата разделяют, и водн. раствор экстрагируют ДХМ (200 мл). Объединенные органические экстракты промывают нас. водн. NaCl , сушат над MgSO_4 и концентрируют при пониженном давлении при 50°C для получения мягкого остатка желтого цвета (57 г). Остаток растворяют в ДХМ (250 мл), выливают на промытый ДХМ слой диоксида кремния (диаметр 9 см и высота 5 см) и элюируют под вакуумом с использованием порций EtOH:ДХМ 1:4 (500 мл). Фракции, содержащие целевое соединение, концентрируют при пониженном давлении при 50°C, и полученный остаток растирают в МТБЭ (250 мл) при температуре окружающей среды в течение около 16 ч. Твердое вещество собирают фильтрованием, промывают МТБЭ (0,1 л) и сушат при 50°C и 10 мБар в течение 8,5 ч для получения указанного в заголовке соединения в виде тонкоизмельченного порошка белого цвета (41,0 г, 80%). ЭР/МС (m/z): 306 (M+H).

Пример получения 7: (8-хлор-3-изохинолил)-1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутан-1-сульфонат.



Карбонат калия (75 г, 542,7 ммоль) и 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутан-1-сульфонилфторид (70 мл, 398,8 ммоль) добавляют к 8-хлор-2Н-изохинолин-3-ону (63 г, 350,7 ммоль) в АЦН (500 мл), и полученную смесь перемешивают при 60°C в течение 15 ч. Смесь фильтруют, и твердое вещество дополнительно промывают АЦН. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Остаток суспендируют в воде (300 мл), и pH доводят до >7 с помощью нас. водн. NaHCO_3 (20 мл). Суспензию перемешивают в течение 2 ч, затем фильтруют. Осадок на фильтре промывают водой и гептаном, затем сушат при пониженном давлении при 35°C. Высушенное твердое вещество растворяют в ДХМ, добавляют силикагель (100 мл), и смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученное твердое вещество наносят на слой из диоксида кремния (400 мл диоксида кремния, предварительно промытого EtOAc:н-гексанами 1:4), и элюируют с вакуумом, используя EtOAc:н-гексаны 1:4 (1,5 л). Элюат концентрируют при пониженном давлении до около 1/20-той от первоначального объема, и для осаждения твердого вещества добавляют н-гексан (50 мл). Твердое вещество собирают фильтрацией, и другие партии твердого вещества получают аналогичной обработкой фильтрата (всего 4 партии). Партии твердого вещества объединяют и сушат при пониженном давлении при 50°C в течение ночи для получения указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества белого цвета (50,82 г, 55,9%). ЭР/МС (m/z) ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$): 462/464 (M+H); ^1H -ЯМР (400,21 МГц, CDCl_3) δ 9,53 (s, 1H), 7,89-7,82 (m, 1H), 7,77-7,69 (m, 2 H), 7,62 (s, 1H); ^{19}F { ^1H }-ЯМР (376,5 МГц,

CDCl_3) δ -80,6 (m), -108,7 (m), -120,8 (m), -125,7 (m).

Пример получения 8: 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-метилпиридин-2-карбоксамид.

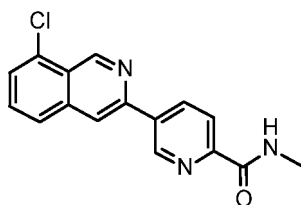


Схема 2, этап А: 3-бром-8-хлоризохинолин (500 мг, 2,06 ммоль), N-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин-2-карбоксамид (584 мг, 2,23 ммоль) и карбонат натрия (655 мг, 6,19 ммоль) суспендируют в 1,4-диоксане (8,2 мл) и воде (1,6 мл). Смесь продувают азотом (5 минут). Добавляют $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ -ДХМ (135 мг, 0,165 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при 95°C в течение 23 ч. Смесь охлаждают до КТ, фильтруют через диатомовую землю и промывают EtOAc (200 мл) и ДХМ (100 мл). Фильтрат концентрируют в вакууме, и остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем, элюируя градиентом от 0-40% ДХМ до ДХМ/MeOH (9:1) для получения указанного в заголовке соединения (610 мг, 98%) в виде твердого вещества светло-коричневого цвета. ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$): 298/300 (M+H), ^1H -ЯМР (400,21 МГц, d_6 -DMCO) δ 9,69 (s, 1H), 9,46 (dd, $J=0,7, 2,2$ Гц, 1H), 8,87-8,85 (m, 1H), 8,78 (d, $J=2,4$ Гц, 1H), 8,77-8,76 (m, 1H), 8,20 (d, $J=8,0$ Гц, 1H), 8,09 (d, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,93-7,83 (m, 2H), 2,87 (d, $J=4,8$ Гц, 3H).

Альтернативный пример получения 8: 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-метилпиридин-2-карбоксамид.

Схема 2, этап А: совместно добавляют 5-бром-N-метилпиридин-2-карбоксамид (10,0 г, 46,0 ммоль), бис(пинаколато)дифторборон (15,5 г, 59,8 ммоль) и KOAc (11,5 г, 115 ммоль) в ЦПМЭ (120 мл), и смесь продувают азотом в течение около 10 мин. Добавляют $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (1,0 г, 1,3 ммоль), и смесь нагревают до 60°C . Смесь перемешивают в атмосфере азота в течение около 4 часов при 81°C (внутренняя температура). Температуру повышают до 94°C (внутренняя температура) и через 45 минут добавляют дополнительный бис(пинаколато)дифторборон (2,5 г, 9,6 ммоль). Нагревание продолжают 4 часа, затем смесь охлаждают до температуры окружающей среды. Добавляют очищенный азотом 2 М водн. карбонат калия (70 мл, 140 ммоль), а затем через 10 минут (8-хлор-3-изохинолил)-1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутан-1-сульфонат (22,28 г, 47,8 ммоль). Смесь продувают азотом в течение около 10 минут, затем нагревают до внутренней температуры 84°C . Через 5 часов добавляют $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (0,5 г, 0,7 ммоль), и нагревание продолжают в течение 3 часов. Нагревание прекращают, и смесь оставляют охлаждаться до 50°C , затем разбавляют 2 М водн. карбонатом калия (75 мл, 150 ммоль) и EtOAc (120 мл). Смесь охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют. Осадок на фильтре прессуют и промывают водой (200 мл) и EtOAc (100 мл). Фазы фильтрата разделяют, и органическую фазу промывают порциями 2 М водн. фосфата калия и нас. водн. NaCl по 50 мл, сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Остаток объединяют в ДХМ (300 мл) с твердым веществом, собранным фильтрацией, и интенсивно перемешивают в течение около 2 часов. Смесь фильтруют, осадок промывают ДХМ (100 мл) и затем отбрасывают. Небольшую водн. фазу отделяют от фильтрата и отбрасывают, а органическую фазу промывают рассолом, затем выливают на слой диоксида кремния (диаметр 9 см и высота 2,5 см) и элюируют ДХМ (3×500 мл) и ацетоном:ДХМ 1:9 (4×500 мл) под вакуумом. Фракции, содержащие цель, объединяют и концентрируют при пониженном давлении, и полученный остаток растирают в МТБЭ (250 мл) при 50°C в течение 1 ч, затем охлаждают на бане с водой, охлажденной до температуры заморозки, в течение 1 ч. Твердое вещество собирают фильтрованием, промывают холодным МТБЭ (2×50 мл) и сушат при пониженном давлении (45°C , 10 мБар) в течение 18 часов для получения указанного в заголовке соединения в виде беловатого твердого вещества (7,51 г, 54,8%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$): 298/300 (M+H).

Пример получения 9: 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-этилпиридин-2-карбоксамид.

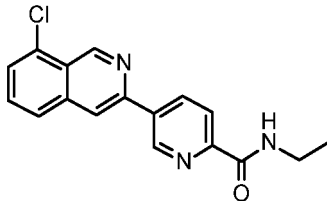


Схема 2, этап А: (8-хлор-3-изохинолил)-1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутан-1-сульфонат (500 мг, 1,08 ммоль), N-этил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин-2-карбоксамид (390 мг, 1,13 ммоль) суспендируют в 1,4-диоксане (11 мл) и добавляют 2 М водн. карбонат калия (1,62 мл, 3,24 ммоль). Раствор продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ -ДХМ (44 мг, 0,054 ммоль), раствор снова продувают азотом, и реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение 15 ч. Смесь охлаждают до КТ, гасят водой и экстрагируют EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические экстракты

промывают раствором, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают досуха для получения маслянистого вещества коричневого цвета. Остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем, элюируя градиентом от 0 % до 70 % н-гексана до EtOAc, для получения указанного в заголовке соединения (275 мг, 81 %) в виде твердого вещества светло-коричневого цвета. ЭР/МС (m/z): 312/314 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO) δ 9,70 (t, J= 0,8 Гц, 1H), 9,47 (dd, J= 0,8, 2,2 Гц, 1H), 8,91 (t, J= 5,9 Гц, 1H), 8,79-8,76 (m, 2H), 8,20 (dd, J= 0,8, 8,2 Гц, 1H), 8,11-8,09 (m, 1H), 7,90-7,83 (m, 2H), 3,34-3,41 (m, 2H), 1,17 (t, J= 7,2 Гц, 3H).

Пример получения 10: N-метил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид.

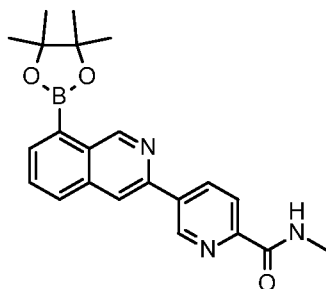


Схема 2, этап В: смесь 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-метилпиридин-2-карбоксамид (750 мг, 2,27 ммоль), бис(пинаколато)дифторборана (1,73 г, 6,80 ммоль), KOAc (556 мг, 5,67 ммоль) и XPhos (111 мг, 0,227 ммоль) в 1,4-диоксане (32 мл) продувают азотом. Добавляют XPhos Pd G2 (182 мг, 0,227 ммоль), и смесь продувают азотом. Смесь перемешивают при 90°C в течение 17 ч. Реакционную смесь охлаждают до КТ, фильтруют через диатомовую землю и промывают EtOAc (3×50 мл). Смесь концентрируют, остаток разбавляют EtOAc (500 мл) и промывают водой (2×80 мл). Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают для получения маслянистого вещества коричневого цвета, которое очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом от 0-70% гексанов до EtOAc, для получения указанного в заголовке соединения (482 мг, 54%) в виде твердого вещества белого цвета. ЭР/МС (m/z): 390 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO) δ 0,08 (s, 1H), 9,47 (dd, J= 0,7, 2,2 Гц, 1H), 8,87 (q, J= 4,7 Гц, 1H), 8,77 (dd, J= 2,2, 8,2 Гц, 1H), 8,68 (d, J= 0,6 Гц, 1H), 8,21-8,17 (m, 2H), 8,13 (dd, J= 1,2, 6,9 Гц, 1H), 7,86 (dd, J= 6,9, 8,2 Гц, 1H), 2,87 (d, J= 4,8 Гц, 3H), 1,43 (s, 12H).

Пример получения 11: 5-[8-(1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид.

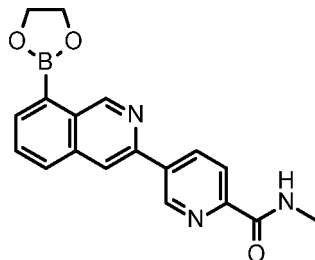


Схема 2, этап В: смесь 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-метилпиридин-2-карбоксамид (5,8 г, 19,3 ммоль), тетрагидроксидифторборана (2,9 г, 31 ммоль), KOAc (5,0 г, 49,9 ммоль) и XPhos Pd G2 (0,39 г, 0,49 ммоль) в безводном этиленгликоле (15 мл) и MeOH (60 мл) продувают азотом в течение 15 мин. Затем смесь перемешивают при 40°C в течение 14 ч. Добавляют воду (150 мл), и смесь перемешивают в течение 3 ч при температуре окружающей среды. Твердое вещество собирают фильтрованием, промывают MeOH:водой 1:3 (50 мл), водой (50 мл) и МТБЭ (50 мл). Осадок на фильтре сушат в вакуумной печи (40°C, 10 мБар) в течение 24 ч для получения указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества бежевого цвета, соответствующего сложному эфиру гликоля в качестве основного вещества (6,96 г, чистота по ЖХМС 91%, 99%). ЭР/МС (m/z): 308 (M+H для бороновой кислоты); ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₄-MeOH) δ 9,42 (s, 1H), 9,38 (d, J= 1,6 Гц, 1H), 8,66 (dd, J= 2,0, 8,4 Гц), 8,43 (s, 1H), 8,22 (dd, 1H, J= 0,8, 8,4 Гц, 1H), 8,09-8,03 (m, 1H), 7,87-7,78 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,03 (s, 3H).

Пример получения 12: N-этил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид.

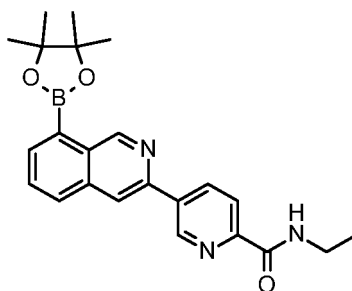


Схема 2, этап В: смесь 5-(8-хлор-3-изохинолил)-N-этилпиридин-2-карбоксамид (275 мг, 0,88 ммоль), бис(пинаколато)диборона (672 мг, 2,65 ммоль), KOAc (216 мг, 2,20 ммоль) и XPhos (43 мг, 0,088 ммоль) в 1,4-диоксане (11 мл) продувают азотом. Добавляют XPhos Pd G2 (69 мг, 0,088 ммоль), смесь продувают азотом и перемешивают при 90°C в течение 21 часа. Смесь охлаждают до КТ, фильтруют через диатомитовую землю и промывают EtOAc (200 мл). Смесь концентрируют, остаток разбавляют EtOAc (300 мл) и промывают водой (2×80 мл). Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают для получения маслянистого вещества коричневого цвета, которое очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом от 0-50 % гексанов до EtOAc, для получения указанного в заголовке соединения (202 мг, 57%) в виде беловатого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 404 (M+H), ¹H-ЯМР (400,21 МГц, d₆-DMCO) δ 10,08 (s, 1H), 9,48 (dd, J= 0,7, 2,2 Гц, 1H), 8,90 (t, J= 6,0 Гц, 1H), 8,77 (dd, J= 2,2, 8,2 Гц, 1H), 8,67 (d, J= 0,5 Гц, 1H), 8,22-8,17 (m, 2H), 8,13 (dd, J= 1,2, 6,9 Гц, 1H), 7,86 (dd, J= 6,9, 8,2 Гц, 1H), 3,41-3,34 (m, 2H), 1,43 (s, 12H), 1,15-1,18 (m, 3H).

Пример 1: 5-[8-(1,5-диметил-6-оксо-7,8-дигидро-4H-пиразоло[4,3-с]азепин-3-ил)-3-изохинолил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид.

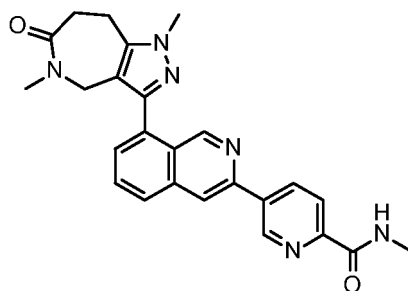


Схема 2, этап С: раствор 3-иод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4H-пиразоло[4,3-с]азепин-6-она (100 мг, 0,33 ммоль) и N-метил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид (153 мг, 0,39 ммоль) в 1,4-диоксане (2,2 мл) и N,N-диметилацетамиде (0,22 мл) обрабатывают 1 М водн. фосфатом калия (0,98 мл, 0,98 ммоль) и продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют Pd(dppf)Cl₂·ДХМ (27 мг, 0,033 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при 95°C в течение 5,5 ч. Неочищенный материал фильтруют через диатомитовую землю, промывают ДХМ и EtOAc и упаривают досуха. Остаток очищают с помощью СКХ-хроматографии при следующих условиях: колонку уравнивают 2 объемами MeOH, соединение растворяют в MeOH (4 мл) и добавляют в колонку, промывают MeOH (3 объема) и элюируют 2 М NH₃ в MeOH (20 мл). Растворители выпаривают для получения маслянистого вещества коричневого цвета. Маслянистое вещество дополнительно очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом от 0-70% ДХМ до ДХМ/MeOH (9:1). Полученное твердое вещество светло-коричневого цвета сушат в вакуумной печи при 40°C в течение 16 часов для получения указанного в заголовке соединения (130 г, 90%). ЭР/МС (m/z): 441 (M+H), ¹H-ЯМР (400,13 МГц, d₆-DMCO) δ 9,56 (s, 1H), 9,46 (d, J= 2,0 Гц, 1H), 8,85 (q, J= 4,9 Гц, 1H), 8,76 (dd, J= 2,0, 8,3 Гц, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,19 (d, J= 8,3 Гц, 1H), 8,13 (d, J= 8,3 Гц, 1H), 7,93 (dd, J= 7,1, 8,3 Гц, 1H), 7,58 (dd, J= 1,2, 7,1 Гц, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,03-2,91 (m, 4H), 2,87 (d, J= 4,9 Гц, 3H), 2,77 (s, 3H).

Альтернативный пример получения 1: 5-[8-(1,5-диметил-6-оксо-7,8-дигидро-4H-пиразоло[4,3-с]азепин-3-ил)-3-изохинолил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид.

Схема 2, этап С: смесь 3-иод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4H-пиразоло[4,3-с]азепин-6-она (9,3 г, 30,17 ммоль) в 2-метил-2-бутаноле (100 мл), N-метил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид (около 52 г, чистота по ЖХМС 68%, 10,5 ммоль) и 2 М водн. фосфата калия (30 мл, 60 ммоль) продувают азотом в течение 30 мин перед добавлением Pd(dppf)Cl₂ (0,71 г, 0,95 ммоль). Смесь нагревают в нагревательном блоке с заданной температурой 90°C. Продувочную трубку снимают, когда температура блока достигает 60°C. Дополнительные порции N-метил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид добавляют через 2 ч и 3,5 ч (общее добавленное количество: 15,45 г, чистота по ЖХМС 68%, 31,53 ммоль). Через суммарных 20 ч нагревания смесь охлаждают до температуры окружающей среды и разбавляют

водой (100 мл) и МТБЭ (250 мл). Смесь фильтруют, и отфильтрованное твердое вещество промывают водой (100 мл) и МТБЭ (100 мл). Фазы фильтрата разделяют, и к органической фазе добавляют гептан (400 мл). Дополнительный твердый осадок собирают фильтрованием через 1 час и объединяют с ранее собранным твердым веществом. Объединенные твердые вещества растворяют в смеси ДХМ (500 мл), ацетона (200 мл) и MeOH (100 мл) и концентрируют на диатомовой земле при пониженном давлении при 50°C. Твердое вещество загружают в подходящий картридж и очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (750 г силикагеля), элюируя градиентом 0-15% EtOH/ДХМ. Фракции, содержащие цель, объединяют и концентрируют при пониженном давлении до около 60 мл прозрачного раствора коричневого цвета. Раствор перемешивают при 60°C и добавляют предварительно приготовленный образец цели. Полученную суспензию перемешивают еще 1 ч при 60°C под положительным давлением азота, затем охлаждают до температуры окружающей среды. Через 16 ч твердое вещество собирают фильтрацией и промывают ледяным EtOH (35 мл). Дополнительный материал выделяют путем концентрирования и дальнейшей хроматографии фильтрата. Две партии твердого вещества объединяют, добавляют в ТГФ (200 мл) и перемешивают с димеркаптотриазин-функционализированной смолой-поглотителем металла (SiliCycle Inc, SiliaMetS® DMT, 2 г, 1,2 ммоль в виде димеркаптотриазина) при 40°C в течение 67 ч. Поглотитель удаляют фильтрованием через 0,45 мкм полипропиленовый мембранный фильтр, и твердое вещество промывают ТГФ (100 мл). Фильтрат и промывочный раствор концентрируют при пониженном давлении при 50°C, и растворитель заменяют на EtOH (конечный объем около 50 мл), в это время образуется белая суспензия. Суспензию выдерживают в течение 1 часа при 60°C под положительным давлением азота, затем охлаждают до температуры окружающей среды. Через 6 часов твердое вещество собирают фильтрованием и промывают ледяным EtOH (25 мл). Твердое вещество сушат при пониженном давлении в течение 30 часов (5 часов при 60°C, 25 часов при 50°C) для получения указанного в заголовке соединения в виде порошка белого цвета (8,95 г, 66%). ЭР/МС (m/z): 441 (M+H).

Пример 2: 5-[8-(1,5-диметил-6-оксо-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-3-ил)-3-изохинолил]-N-этилпиридин-2-карбоксамид.

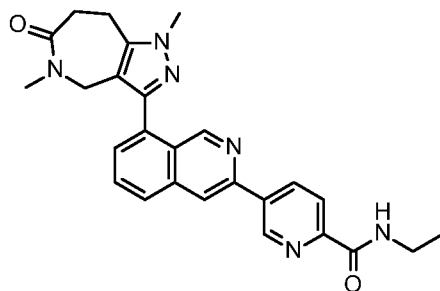


Схема 2, этап С: раствор 3-иод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-она (130 мг, 0,43 ммоль), N-этил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид (353 мг, 0,49 ммоль) в 1,4-диоксане (2,85 мл) и N,N-диметилацетамиде (0,28 мл) обрабатывают 1 М водн. фосфатом калия (1,27 мл, 1,27 ммоль) и продувают азотом в течение 5 минут. Добавляют Pd(dppf)Cl₂·ДХМ (35 мг, 0,042859 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение 17 часов. Материал охлаждают до КТ, фильтруют сквозь диатомитовую землю, промывают ДХМ и EtOAc и упаривают досуха. Остаток очищают с помощью СКХ-хроматографии при следующих условиях: колонку уравнивают 2 объемами MeOH, соединение растворяют в MeOH (4 мл) и добавляют в колонку, промывают MeOH (3 объема) и элюируют 2 М NH₃ в MeOH (20 мл). Растворители выпаривают для получения маслянистого вещества коричневого цвета. Материал дополнительно очищают обращенно-фазовой хроматографией с использованием 10 мМ буфера бикарбоната аммония, pH=9 и элюированием градиентом от 20 % до 60 % АЦН в буфере для получения указанного в заголовке соединения (83 мг, 42%) в виде твердого вещества светло-коричневого цвета. ЭР/МС (m/z): 455 (M+H), ¹H-ЯМР (400,13 МГц, d₆-DMCO) δ 9,57 (s, 1H), 9,46 (dd, J= 0,7, 2,2 Гц, 1H), 8,89 (t, J= 6,1 Гц, 1H), 8,76 (dd, J= 2,2, 8,3 Гц, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,20-8,18 (m, 1H), 8,13 (d, J= 8,6 Гц, 1H), 7,93 (dd, J= 7,1, 8,3 Гц, 1H), 7,58 (dd, J= 1,1, 7,1 Гц, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,41-3,34 (m, 2H), 3,04-2,91 (m, 4H), 2,77 (s, 3H), 1,17 (t, J=7,2 Гц, 3H).

Альтернативный пример получения 2: 5-[8-(1,5-диметил-6-оксо-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-3-ил)-3-изохинолил]-N-этилпиридин-2-карбоксамид.

Схема 2, этап С: смесь 3-иод-1,5-диметил-7,8-дигидро-4Н-пиразоло[4,3-с]азепин-6-она (3,50 г, 11,36 ммоль) и N-этил-5-[8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3-изохинолил]пиридин-2-карбоксамид (4,71 г, 11,56 ммоль) в EtOH (35 мл) и 2 М водн. фосфата калия (11 мл, 22 ммоль) продувают азотом в течение 15 минут. Добавляют трициклогексилфосфин (0,19 г, 0,68 ммоль) и Pd₂dba₃ (0,21 г, 0,22 ммоль), и продувание азотом продолжают еще 10 минут. Начинают нагрев, и продувочную трубку снимают, когда нагревательный блок достигает 50°C. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 4 часов, затем охлаждают до КТ. Добавляют димеркаптотриазин-функционализированную смолу-поглотитель металла (SiliCycle, Inc, SiliaMetS® DMT, загрузка 0,60 ммоль/г, 2,0 г, 1,2 ммоль), и смесь

перемешивают при 50°C в течение 3,5 часов, затем охлаждают до КТ. Добавляют воду (120 мл), и смесь перемешивают при КТ в течение 30 минут. Смесь фильтруют сквозь диатомитовую землю, и слой промывают EtOH/водой 1:3 (40 мл). Фильтрат разбавляют водой (400 мл) и перемешивают при температуре окружающей среды в течение 1,5 часов. Полученное твердое вещество белого цвета собирают фильтрованием, промывают EtOH/водой (1:6) (70 мл), водой (100 мл) и сушат при пониженном давлении в течение 16 ч при 50°C для получения указанного в заголовке неочищенного соединения. Неочищенное твердое вещество растворяют в EtOH (40 мл) и ДХМ (10 мл) и фильтруют сквозь диатомитовую землю. Фильтрат концентрируют при пониженном давлении при 50°C до тех пор, пока не останется около 20 мл раствора. Раствор перемешивают в нагревательном блоке при 70°C и добавляют гептан (20 мл) в течение около 2 мин. Смесь перемешивают в нагревательном блоке в течение 1 часа, в течение которого образуется твердое вещество белого цвета. Нагревание прекращают, и смесь оставляют охлаждаться при перемешивании. Через 6 часов твердое вещество собирают фильтрованием и промывают EtOH/гептаном 1:1 (10 мл) и гептаном (10 мл), а затем сушат при пониженном давлении при 50°C в течение 13 ч для получения указанного в заголовке соединения (4,2 г, 81 %) в виде твердого вещества белого цвета. ЭР/МС (m/z): 455 (M+H).

Биологические анализы

Анализ NanoBRET

Клетки НЕК293 высевают из расчета 10×10^6 клеток/16 мл в ДМИС + 10 % ФБС в колбу Т-75 и оставляют для прикрепления на 4-6 часов. Реагенты для трансфекции разводят в среде Opti-MEM (без фенолового красного, без ФБС) и 8% Fugene HD, содержащем плазмиды экспрессии, до конечной концентрации следующего: 1: Гистон H3.3 HaloTag ДНК (Promega, 0,02 мкг) + NanoLuc-CREBBP-BD (Promega, 0,0002 мкг); 2: Гистон H3.3 HaloTag ДНК (Promega, 0,02 мкг) + NanoLuc-EP300-BD (Promega, 0,0002 мкг); 3: Гистон H4 HaloTag ДНК (0,02 мкг) + NanoLuc-BRD4 полной длины (Promega, 0,0002 мкг). Смеси ДНК/Fugene оставляют при комнатной температуре на 10 минут. Смесь для трансфекции (800 мкл) добавляют в каждую колбу и сразу же перемешивают, чтобы покрыть клетки. Планшеты возвращают в инкубатор для трансфекции в течение ночи. На следующий день лиганд HaloTag NanoBRET 618 (20 мкл/флакон с 0,1 мМ) размораживают при КТ. Культуральную среду удаляют из колб с трансфицированными клетками, промывают ФБС (5 мл) и обрабатывают трипсином (3 мл) при КТ для отделения клеток. Трипсинизированные клетки ресуспендируют в среде ДМИС + 10% ФБС (7 мл) и собирают в коническую пробирку (50 мл). Клетки центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин, затем ресуспендируют в Opti-MEM (без фенолового красного) + 4% ФБС. Лиганд HaloTag NanoBRET 618 (1 мкл 0,1 мМ) добавляют к клеткам при конечной концентрации 100 нМ. Клетки добавляют в белые 96-луночные планшеты с непрозрачным дном (Costar 3917) и инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO₂.

Соединение серийно разбавляют и добавляют в 96-луночные планшеты (2 мкл, 10 мМ, 3-кратные разведения, 100 % ДМСО). В планшет для соединения добавляют среду (98 мкл)/4% ФБС до конечной концентрации 200 мкМ, 2% ДМСО. Планшеты с контрольным соединением (MIN) готовят при 200 мкМ, 2% ДМСО (конечная концентрация 20 мкМ, конечная концентрация 0,2%) путем добавления контрольного ингибитора (10 мкл) в среду (490 мкл)/4% ФБС. Контрольный ингибитор MIN (50 мкл) добавляют в колонки контрольного планшета от 1А до 1Н. Планшеты MAX готовят с 2% ДМСО (конечная концентрация 0,2%) путем добавления ДМСО (10 мкл) к среде (10 мкл)/4% ФБС. Maximum (50 мкл) добавляют в колонки контрольного планшета от 12А до 12Н. Клетки обрабатывают 10 мкл/лунку серийно разведенного Примера 1. Планшеты с клетками инкубируют при 37°C/5 % CO₂. Планшеты CREBBP/EP300 считываются после 4 часов инкубации, а планшеты BRD4 считываются после инкубации в течение ночи. Чтобы проявить планшеты для считывания, всем реагентам дают достичь КТ перед использованием. 5 мМ исходного субстрата NanoBRET Nano-Glo разбавляют до 50 мкМ в Opti-MEM (без фенолового красного, без сыворотки). Добавляют субстрат Nano-Glo (25 мкл/лунка 50 мкМ). Планшет встряхивают в течение 1 мин для перемешивания и в течение 10 мин считывают показания на планшет-ридере Envision со следующими настройками: Зеркало: Luminescence; Эмиссионный фильтр: E600LP; 2-й выхлопной фильтр: D460/50; Высота измерения (мм): 6,5; Время измерения (с): 0,2 с.

Таблица 1

Соединение	hBRD4 IC ₅₀ (мкМ)	hCREBBP IC ₅₀ (нМ)	hEP300 IC ₅₀ (нМ)
Пример 1	5,57 ± 4,10 n=6	16,0 ± 6,64 n=6	15,1 ± 2,75 n=6
Пример 2	11,8	18,6 ± 4,09, n=2	26,1 ± 16,5, n=2

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Как приведено в табл. 1, данные демонстрируют, что соединения примера 1 и примера 2 сильно ингибируют CREBBP и EP300 *in vitro*. Кроме того, табл. 1 показывает, что соединения примера 1 и примера 2 проявляют селективность в отношении CREBBP/EP300 по сравнению с бромодоменом BRD4.

Анализ клеточной пролиферации в 22Rv1

Целью следующего анализа клеточной пролиферации является определение того, влияет ли соединение Примера 2 и его комбинации на пролиферацию клеток.

Клетки 22Rv1 (приобретенные в ATCC CRL-2505) высевают с плотностью 1000 клеток на лунку в RPMI 10% ФБС (объем 20 мкл) в 384-луночный планшет с прозрачным дном для культивирования клеток. Планшеты инкубируют при 37°C и 5% CO₂. На следующий день в клетки вводят дозу соединения примера 2 и соединения примера 2 в комбинации с известными противораковыми терапевтическими средствами, приведенными в табл. ниже. Акустический дозатор Echo 555 используется для приготовления серийных разведений (1:3) соединения примера 2 и его комбинаций в концентрациях в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Затем клетки дозируют путем добавления 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию ДМСО 0,2% с конечной концентрацией дозы в диапазоне от 20 мкМ до 0,001 мкМ для соединения примера 2 и его комбинаций.

Среда, содержащая 0,2 % ДМСО, используется для точки максимума, а 2 мкМ стауроспорина в среде для выращивания, содержащей 0,2% ДМСО, используется для точки минимума. После дозирования соединения примера 2 и его комбинаций планшеты с клетками инкубируют при 37°C и 5% CO₂. Через семь дней после добавления исследуемого соединения планшеты удаляют из инкубатора и в каждую лунку добавляют холодный EtOH (96%, 65 мкл). Через 30 мин среду удаляют и в каждую лунку добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и раствор йодида пропидия в ФБС 1:1000. Планшеты герметично закрывают и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре и защищают от света. Планшеты затем сканируют при помощи ACUMEN EXPLORER™ (лазерно-сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD). Количество клеток 22Rv1 оценивается с помощью оценочного количества клеток, рассчитанного с помощью параметра площади (отношение общей площади общей популяции клеток), заданного диапазона пиковой интенсивности FL-3 (ПИ) и средней площади одиночной популяции клеток, определяемой периметром. Затем данные обрабатывают с помощью инструмента скрининга NGR. Данные анализируют с использованием нелинейного логистического уравнения с 4-параметрами (кривая логистическая концентрация-ответ с четырьмя параметрами): $Y = \text{ниж} + \frac{(\text{верх} - \text{ниж})}{1 + (x/IC_{50})^{\text{угол}}}$, где Y = % ингибирования, X = концентрация, обеспечивающая ингибирование у%, "ниж" = минимальное значение у на кривой, "верх" = максимальное значение у на кривой, и угол = крутизна кривой при IC₅₀. %Инг = [(среднее Max-x/среднее Max - среднее Min)]-100.

Процент ингибирования соединения примера 2 и его комбинаций в клетках рака простаты 22Rv1 при различных концентрациях приведен в таблицах 2 и 3 ниже.

Таблица 2

Партнер в комбинации	% Ингибирования пролиферации клеток (концентрация)		
	Партнер	Пример 2	Партнер + Пример 2
Даролутамид	6,18 (2,2 мкМ)	19,34 (2,2 мкМ)	36,0 (1,1/1,1 мкМ)
Энзалутамид	0,41 (3,3 мкМ)	46,3 (3,3 мкМ)	59,09 (3,3/3,3 мкМ)
Абемациклиб	62,4 37 нМ	35,37 (370 нМ)	82,1 (37/370 нМ)
Альпелисиб	45,34 (370 нМ)	18,68 (370 нМ)	69,72 (370/370 нМ)

Таблица 3

Партнер в комбинации	% Ингибирования пролиферации клеток (концентрация)		
	Партнер	Пример 2	Партнер + Пример 2
Даролутамид	6,69 (740 нМ)	12,25 (740 нМ)	25,41 (370/370 нМ)
Энзалутамид	-0,12 (370 нМ)	31,53 (370 нМ)	41,82 (370/370 нМ)
Абемациклиб	34,32 (12 нМ)	17,44 (120 нМ)	73,08 (12/120 нМ)
Альпелисиб	33,07 (120 нМ)	9,62 (120 нМ)	75,54 (120/120 нМ)

Результаты этого анализа демонстрируют антипролиферативную активность соединения Примера 2 и соединения Примера 2 в комбинации с противораковыми терапевтическими средствами даролутамидом, энзалутамидом, абемакликсом и альпелисибом в клетках рака простаты 22Rv1 (ARFL/ARV7; P1K3CAmut). Как видно из табл. 2, пролиферация клеток ингибируется соединением Примера 2. Кроме того, пролиферация клеток ингибируется соединением примера 2 в комбинации с противораковыми терапевтическими средствами, приведенными в табл. 2. Аналогичным образом, как видно из табл. 3, пролиферация клеток ингибируется соединением примера 2. Кроме того, пролиферация клеток ингибируется соединением примера 2 в комбинации с противораковыми терапевтическими средствами, приведенными в табл. 3.

Анализ ингибирования роста клеток

Линии опухолевых клеток высевают в 96-луночные планшеты с черными стенками из поли-Д-лизины (Corning № 354640) и инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 ч. Соединение добавляли в разведениях 1:3 в ДМСО, и клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 7 дней. Для прикрепленных клеточных линий клетки фиксировали и окрашивали йодидом пропидия и сканировали на Acumen (настройка - канал 3). Для суспензионных клеточных линий рост клеток контролировали с помощью реагента Cell Titer-Glo.

Таблица 4

Клеточная линия	Ингибирование роста (мкМ)	
	Пример 1	Пример 2
SW780	0,001	0,004
NCI-H1048	0,010	0,018
NCI-H211	0,036	0,065
EOL-1	0,0008	0,001
MDA-MB-453	0,028	0,035
Kasumi (AML1-ETO)	НО	0,008
SKNO-1 (AML1-ETO)	НО	0,018
KG-1a	0,037	0,002
THP-1	НО	0,029
KG-1	НО	0,083
MOLM-16	НО	0,129
OCI-AML2	НО	0,207
OCI-AML3	НО	0,226
GDM1	НО	0,28
HL-60	НО	0,328

Табл. 4 иллюстрирует ингибирование роста линий раковых клеток соединениями примера 1 и примера 2.

Анализ платформы Bromo KdELECT®

Целью этого анализа является оценка вовлеченности и селективности мишени *in vitro* (<https://www.discoverx.com/services/drug-discovery-development-services/epigenetic-profiling/bromoscan-epigenetic-profiling/bromokdelect>). Измерение анализа основано на количестве бромодомена, захваченного в исследуемых и контрольных образцах, с использованием технологии количественной ПЦР, которая обнаруживает метку ДНК, связанную с бромодоменом. Соединения, которые связывают активный сайт бромодомена, предотвращают его связывание с иммобилизованным лигандом и будут уменьшать количество бромодомена, захваченного на твердой подложке. Однако молекулы, которые не связывают бромодомен, не влияют на количество белка, захваченного твердой подложкой. Таким образом, активность соединения отслеживают путем измерения количества захваченного бромодомена в исследуемых образцах по сравнению с контрольными образцами с помощью количественной ПЦР. Связывающая способность для взаимодействий испытуемого соединения с бромодоменом рассчитывают путем измерения количества бромодомена, захваченного на твердой подложке, в зависимости от концентрации испытуемого соединения.

Связывающая способность (K_d) соединений примеров 1 и 2 по отношению к CREBBP, EP300 и BRD4 (бромодомен 1 (BD1) и бромодомен 2 (BD2)) определяют в исследовании зависимости реакции от дозы по 11 точкам (см. табл. 5). Данные представлены как среднее значение из повторяющегося эксперимента.

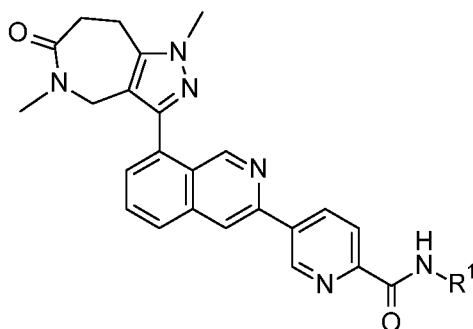
Таблица 5

Ген	Пример 1 K_d (нМ)	Пример 2 K_d (нМ)
EP300	0,16	0,095
CREBBP	1,1	0,325
BRD4 (BD1)	2000	2650
BRD4, BD1, BD2	4400	7400
BRD4 (BD2)	6700	6800

Как показано в табл. 5, соединение примера 1 проявляет связывающую способность 0,16 нМ для EP300 и связывающую способность 1,1 нМ для CREBBP. Кроме того, как показано в табл. 5, связывающая способность соединения из примера 1 является селективной для CREBBP/EP300 по сравнению с бромодоменом BRD4. Также в табл. 5 показано, что соединение примера 2 проявляет связывающую способность 0,095 нМ для EP300 и связывающую способность 0,325 нМ для CREBBP. Кроме того, как показано в табл. 5, связывающая способность соединения из примера 2 является селективной для CREBBP/EP300 по сравнению с бромодоменом BRD4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы

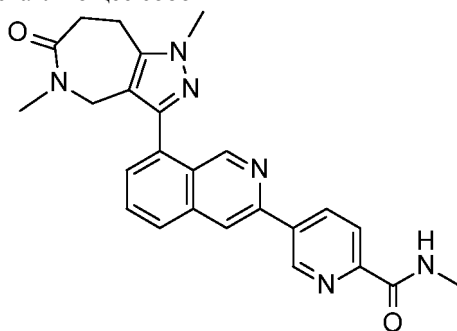


где R^1 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$;
или его фармацевтически приемлемая соль.

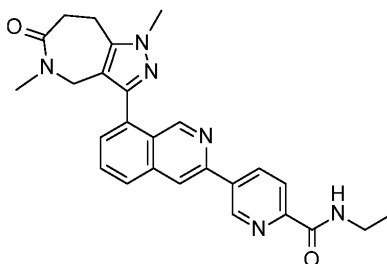
2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой $-CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п.2, представляющее собой



5. Соединение по п.3, представляющее собой



6. Соединение или соль по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что соединение или соль являются кристаллическими.

7. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что рак представляет собой плоскоклеточный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны, уротелиальный рак верхних мочевыводящих путей, карциному эндометрия, эндометриоидную карциному матки, мелкоклеточный рак легких (МРЛ), рак простаты, лимфому, рак пищевода, рак легких, рак мочевого пузыря, плоскоклеточную гистологию, эндометриоз матки, состояния, связанные с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительные состояния, состояния, связанные со сверхэкспрессией тус, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественные миеломы и рак, вызванный вирусом папилломы человека.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что плоскоклеточный рак выбран из рака анального канала, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака легких и рака ротоглотки.

10. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения рака.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что рак выбран из плоскоклеточного рака, уротелиального рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака толстой кишки, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, уротелиального рака верхних мочевыводящих путей, карциномы эндометрия, эндометриоидной карциномы матки, мелкоклеточного рака легких (МРЛ), рака простаты, лимфомы, рака пищевода, рака легких, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной гистологии, эндометриоза матки, состояний, связанных с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительных состояний, состояний, связанных со сверхэкспрессией тус, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, множественных миелом и рака, вызванного вирусом папилломы человека.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что плоскоклеточный рак выбран из рака анального канала, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака легких и рака ротоглотки.

13. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для производства лекарственного средства для лечения рака.

14. Применение по п.13, отличающееся тем, что рак выбран из плоскоклеточного рака, уротелиального рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака толстой кишки, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, уротелиального рака верхних мочевыводящих путей, карциномы эндометрия, эндометриоидной карциномы матки, мелкоклеточного рака легких (МРЛ), рака простаты, лимфомы, рака пищевода, рака легких, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной гистологии, эндометриоза матки, состояний, связанных с транслокацией AML-ETO, андроген-рецептор-положительных состояний, состояний, связанных со сверхэкспрессией тус, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, множественных миелом и рака, вызванного вирусом папилломы человека.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что плоскоклеточный рак выбран из рака анального канала, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака легких и рака ротоглотки.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-6 с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

