

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045742**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.21

(21) Номер заявки
202290395

(22) Дата подачи заявки
2020.08.24

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

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИНГИБИТОРА CD73

(31) 19382733.4

(32) 2019.08.29

(33) EP

(43) 2022.05.19

(86) PCT/US2020/047645

(87) WO 2021/041319 2021.03.04

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

(72) Изобретатель:
**Гарсия-Серрада Сусана Мария, Лу
Юй, Ремик Дэвид Майкл (US)**

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

(56) RAHILA RAHIMOVA ET AL.: "Identification of allosteric inhibitors of the ecto-5'-nucleotidase (CD73) targeting the dimer interface", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 14, № 1, 29 January 2018 (2018-01-29), p. e1005943, XP055584046, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005943, the whole document

WO-A1-2017120508

MINO R CAIRA ED - MONTCHAMP JEAN-LUC: "Crystalline Polymorphism of Organic Compounds", TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY; [TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY], SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, 1 January 1998 (1998-01-01), p. 163-208, XP008166276, ISSN: 0340-1022, DOI: 10.1007/3-540-69178-2_5 [retrieved on 1999-02-26], the whole document

WO-A1-2019168744

(57) Изобретение относится к кристаллическим формам 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона и содержащим их фармацевтическим композициям, которые ингибируют активность CD73 и применимы для лечения рака.

B1

045742

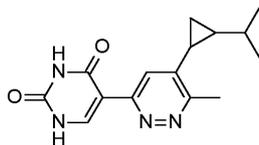
045742 B1

Настоящее изобретение относится к кристаллическим формам 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона и содержащим их фармацевтическим композициям, которые ингибируют активность CD73 и применимы для лечения рака.

CD73, также известный как 5'-нуклеотидаза или экто-5'-нуклеотидаза (ЕС 3.1.3.5), представляет собой фермент, который превращает 5'-мононуклеотиды в нуклеозиды. CD73 экспрессируется во многих тканях и активируется в раковых тканях, а путь CD73 промотирует рост опухоли вследствие лимитирования противоопухолевого Т-клеточного иммунитета посредством передачи сигналов через аденозиновый рецептор (Zhang B., Cancer Research, 2010, 70:6407-6411; Antonioli L. et al., Drug Discovery Today, 2017, 22:1686-1696). У мышей с дефицитом CD73 повышен противоопухолевый иммунитет, и они резистентны к экспериментальному метастазу (Stagg J. et al., Cancer Research, 2011, 71:2892-2900). Внеклеточный аденозин, выработанный опухолевым CD73, накапливается в микроокружении опухоли, нарушает противоопухолевый Т-клеточный иммунитет (Zhang B., Antonioli L.) и связан с ускользанием опухолей от иммунного ответа, пролиферацией, миграцией, неоваскуляризацией, метастазом и химиорезистентностью опухолевых клеток (Inoue Y et al., Oncotarget, 2017, 8:8738-8751). Также сообщалось, что повышенная экспрессия CD73 связана с повышенной иммуносупрессией (Jin D. et al., Cancer Res., 70:2245-2255 (2010)).

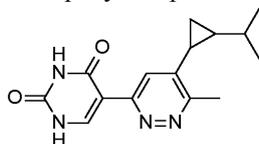
Таким образом, путь CD73 оказывает иммуносупрессивное действие, и сделано предположение, что блокирование пути CD73 может быть пригодно для лечения рака (Allard D. et al., Immunotherapy, 2016, 8:145-163). Ингибиторы CD73 проходят клинические испытания на лечение рака (Hay C.M. et al., Oncoimmunol., 2016, 5(8):e1208875, Allard D).

Заявка США № 16/481146, озаглавленная "Ингибиторы CD73", представляет собой национальную фазу США международной заявки № PCT/US2019/019074 и раскрывает определенные молекулы-ингибиторы CD73, включая соединение



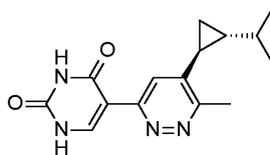
(формула I, которая представляет собой 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион).

Соответственно настоящее изобретение предусматривает кристаллические формы соединения



(5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона).

В предпочтительном варианте реализации кристаллическая форма представляет собой форму соединения

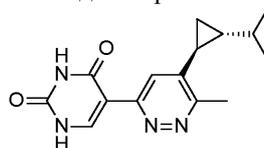


(5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона).

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую кристаллическую форму соединения 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей. В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит кристаллическую форму 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

Кристаллическая форма 1.

В одном предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере 500 г безводной кристаллической формы соединения формулы



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

В другом предпочтительном варианте реализации безводная кристаллическая форма в композиции характеризуется по меньшей мере одним из

(а) пиком на рентгенограмме при угле дифракции 2-тета $4,7^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при $11,7, 15,8, 16,0, 26,8$ и $27,2^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и

(b) спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $25,4, 28,9, 43,1, 109,3, 124,4, 128,2$ и $160,7$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации безводная кристаллическая форма дополнительно характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает один или более пиков, отнесенных относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $16,6, 18,3, 20,7, 22,1, 23,9, 26,6, 27,6, 28,1, 30,2, 31,2, 32,2, 38,6, 39,7, 41,2, 111,0, 112,0, 130,7, 145,1, 146,3, 150,1, 151,0, 153,4, 156,7, 157,6, 158,6, 159,3, 160,7, 163,4, 165,9, 169,4$ и $170,2$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации безводная кристаллическая форма характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $16,6, 18,3, 20,7, 22,1, 23,9, 25,4, 26,6, 27,6, 28,1, 28,9, 30,2, 31,2, 32,2, 38,6, 39,7, 41,2, 43,1, 109,3, 111,0, 112,0, 124,4, 128,2, 130,7, 145,1, 146,3, 150,1, 151,0, 153,4, 156,7, 157,6, 158,6, 159,3, 160,7, 163,4, 165,9, 167,0, 169,4$ и $170,2$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации безводная кристаллическая форма в композиции представляет собой соединение 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион.

В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 95% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 96% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 97% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 98% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации композиция по меньшей мере на 99% свободна от примесей.

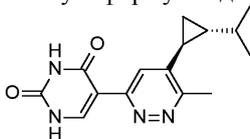
В другом предпочтительном варианте реализации композиция представляет собой гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой влажную гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой сухую гранулированную композицию.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 кг композиции. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1 кг композиции. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственный контейнер, содержащий по меньшей мере 5 кг композиции.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую композицию и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

Кристаллическая форма 2.

В другом предпочтительном варианте реализации кристаллическая форма представляет собой десольватированную (безводную) кристаллическую форму соединения формулы



(5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион), который характеризуется по меньшей мере одним из

(а) пиком на рентгенограмме при угле дифракции 2-тета $4,3-5,5^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при $6,4, 9,6, 11,0$ и $11,6^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и

(b) спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $17,2, 28,7, 122,0, 126,1, 143,6$ и $155,5$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации пик на рентгенограмме при угле дифракции 2-тета $4,3-5,5^\circ$ находится при угле дифракции 2-тета $4,3^\circ$.

В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма дополнительно характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает один или более пиков, отнесенных относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $18,9, 21,1, 22,5, 24,4, 26,7, 27,8, 29,7, 39,7, 41,3, 45,5, 50,1, 110,7, 111,7, 112,4, 125,0, 129,1, 144,8, 146,2, 147,2, 149,9, 151,1, 153,0, 155,5, 157,2, 159,0, 160,6, 161,4, 162,7, 164,8, 167,0, 168,3$ и $170,4$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при 17,2, 18,9, 21,1, 22,5, 24,4, 26,7, 27,8, 28,7, 29,7, 39,7, 41,3, 45,5, 50,1, 110,7, 111,7, 112,4, 122,0, 125,0, 126,1, 129,1, 143,6, 144,8, 146,2, 147,2, 149,9, 151,1, 153,0, 155,5, 157,2, 159,0, 160,6, 161,4, 162,7, 164,8, 167,0, 168,3 и 170,4 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

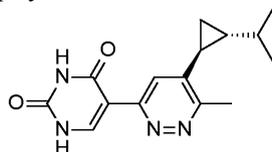
В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 95% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 96% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 97% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 98% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации десольватированная (безводная) кристаллическая форма по меньшей мере на 99% свободна от примесей.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 г десольватированной (безводной) кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере 100 г десольватированной (безводной) кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации композиция представляет собой гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой влажную гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой сухую гранулированную композицию.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 кг десольватированной (безводной) кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1 кг десольватированной (безводной) кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую десольватированную (безводную) кристаллическую форму и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

Кристаллическая форма 3.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает полугидратную кристаллическую форму соединения формулы



(5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона).

В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма характеризуется по меньшей мере одним из

(а) пиком на рентгенограмме при угле дифракции 2-тета $5,0^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при 16,4, 17,8 и $26,6^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и

(б) спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при 23,5, 34,6, 110,2, 124,1, 126,8 и 166,2 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма дополнительно характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает один или более пиков, отнесенных относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при 16,5, 18,9, 19,6, 20,4, 22,6, 24,4, 26,0, 27,4, 28,3, 30,0, 30,9, 38,4, 40,5, 110,8, 130,4, 131,2, 146,0, 147,1, 150,4, 151,2, 153,4, 157,1, 157,7, 158,3, 159,6, 163,1 и 169,7 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма характеризуется спектром твердофазного ЯМР ^{13}C , который включает пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при 16,5, 18,9, 19,6, 20,4, 22,6, 23,5, 24,4, 26,0, 27,4, 28,3, 30,0, 30,9, 34,6, 38,4, 40,5, 110,2, 110,8, 124,1, 126,8, 130,4, 131,2, 146,0, 147,1, 150,4, 151,2, 153,4, 157,1, 157,7, 158,3, 159,6, 163,1, 166,2 и 169,7 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 95% свободна

от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 96% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 97% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 98% свободна от примесей. В другом предпочтительном варианте реализации полугидратная кристаллическая форма по меньшей мере на 99% свободна от примесей.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 г полугидратной кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере 100 г полугидратной кристаллической формы.

В другом предпочтительном варианте реализации композиция представляет собой гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой влажную гранулированную композицию. В другом предпочтительном варианте реализации гранулированная композиция представляет собой сухую гранулированную композицию.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 кг полугидратной кристаллической формы. В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает производственную тару, содержащую по меньшей мере 1 кг полугидратной кристаллической формы.

В другом предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую полугидратную кристаллическую форму и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

Методы лечения.

В настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества кристаллической формы соединения 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона.

В другом предпочтительном варианте реализации рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек. В одном варианте реализации рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В другом варианте реализации рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких.

Настоящее изобретение также обеспечивает кристаллическую форму соединения 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона для применения в терапии.

Настоящее изобретение также обеспечивает кристаллическую форму соединения 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона для применения в лечении рака. В предпочтительном варианте реализации кристаллическая форма представляет собой форму соединения 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона.

Настоящее изобретение также обеспечивает кристаллическую форму соединения 5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона при производстве лекарств для лечения рака.

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

В предпочтительном варианте реализации пациентом является пациент, у которого определена активность CD73 в сыворотке. В одном предпочтительном варианте реализации "определение активности CD73" означает определение факта наличия активности CD73. Способы определения уровня экспрессии CD73 или активности CD73 известны специалистам в данной области техники, например, см. S Morello et al., J. Trans. Med., 2017, 15:244. В другом предпочтительном варианте реализации "определение активности CD73" означает количественное определение степени превращения АМФ в аденозин под действием CD73, и в

данном документе предложен анализ на основе ЖХ-МС, облегчающий количественное определение уровня активности CD73.

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

В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами. Неограничивающие примеры противоопухолевых агентов включают рамцирумаб, нецитумаб, оларатумаб, гемцитабин, пеметрексед, галунисертиб, абемациклиб, gefитиниб, вемурафениб, дабрафениб, траметиниб, цисплатин, карбоплатин, дакарбазин, липосомный доксорубин, доцетаксел, циклофосфамид и доксорубин, навельбин, эрибулин, паклитаксел, частицы связанного с белком паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилон, капецитабин, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), цетуксимаб и ингибитор EGFR, ингибитор Raf, ингибитор B-Raf, ингибитор ERK, ингибитор CDK4/6, ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы, ингибитор TGF β и ингибитор рецептора TGF β .

В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более иммуноонкологическими агентами. В одном предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, антитело-агонист анти-CD137 или анти-CTLA4 антитело. Неограничивающие примеры иммуноонкологических агентов включают ниволумаб, ипилимумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, тремелимумаб, урелумаб, лирилумаб, атезолизумаб, дурвалумаб и анти-PD-L1 антитело LY3300054 (последовательности тяжелой и легкой цепей которого описаны в WO 2017/034916 и US 2017/0058033 как SEQ ID NO: 10 и 11 соответственно). В одном предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, а иммуноонкологический агент представляет собой LY3300054.

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

В другом предпочтительном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения меланомы, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой ингибитор BRAF, анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой ингибитор BRAF. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации антитело против PD-L1 представляет собой LY3300054 (последовательности тяжелой и легкой цепей которого представлены в WO 2017/034916 и US 2017/0058033 как SEQ ID NO: 10 и 11 соответственно).

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

В другом предпочтительном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака поджелудочной железы, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализа-

ции другой агент представляет собой абемациклиб. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион, а другой агент представляет собой абемациклиб.

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

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

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

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

"Эффективное количество" означает такое количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение или его фармацевтически приемлемую соль по данному изобретению, которое вызывает биологический или медицинский ответ или требуемый терапевтический эффект у пациента, наблюдаемый лечащим клиницистом. В одном варианте реализации предложенное соединение или его фармацевтически приемлемая соль ингибирует превращение АМФ в аденозин в анализе фермента CD73 *in vitro* или *ex vivo*. В другом варианте реализации предложенное соединение или его фармацевтически приемлемая соль ингибирует превращение АМФ в аденозин в цельной крови мышей, полученной от животных, которым введены различные дозы указанного соединения.

В данном контексте термин "пациент" относится к человеку.

Эффективное количество может быть без труда установлено лечащим врачом-диагностом как специалистом в данной области техники, с использованием известных технологий и посредством наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного для пациента количества наблюдающий врач-диагностик учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: биологический вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень вовлеченности или тяжесть заболевания или расстройства; реакция отдельного пациента; конкретное введенное соединение; способ введения; характеристики биодоступности введенного препарата; выбранная схема лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие релевантные обстоятельства.

Соединения по данному изобретению предпочтительно составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения, включая пероральный, внутривенный и трансдермальный способы. Наиболее предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.V. Troy, ред., 21-е издание, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)).

Специалистам в данной области техники понятно, что соединения по данному изобретению могут образовывать соли. Соединения по данному изобретению содержат основные гетероциклы и, соответственно, вступают в реакцию с любыми из множества неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот. Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот и общие методики их получения известны в данной области техники. См., например, P. Stahl et al., Handbook of pharmaceutical salts: properties, selection and use (VCHA/Wiley-VCH, 2008).

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемые соли" или "фармацевтически приемлемая соль" относится к относительно нетоксичной неорганической и органической соли и солям соединения по данному изобретению (S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, том 66, № 1, январь, 1977).

Используемый здесь термин "гранулированная композиция" относится к композиции в гранулированной форме, которая в процессе фармацевтического производства является композицией-предшественником фармацевтической композиции.

Используемый здесь термин "производственная тара" относится к таре, которая используется при производстве фармацевтической тары, но не в лаборатории медицинской химии. Примеры производственной тары включают, но не ограничиваются ими, бункерный коллектор, поддон, поддон для сушки,

поддон для гранулятора, лоток для сушки, ковш для гранулятора и чашу для смешивания.

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

В данном контексте следующие термины имеют следующие указанные значения: "ACN" относится к ацетонитрилу; "DAST" относится к трифториду диэтиламиносеры; "DCM" относится к дихлорметану; "DMAP" относится к 4-диметиламинопирдину; "ДМСО" или "дмсо" относится к диметилсульфоксиду; "э.и." относится к энантиомерному избытку; "ЭР/МС" относится к масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением; "EtOAc" относится к этилацетату; "Et₂O" относится к диэтиловому эфиру; "FBS" относится к эмбриональной бычьей сыворотке; "ГХ-МС" относится к газовой хроматомасс-спектрометрии; "HBSS" относится к сбалансированному солевому раствору Хэнкса; "IC₅₀" относится к полумаксимальной ингибирующей концентрации; "ЛАН" относится к алюмогидриду лития; "ЖХ-ЭР/МС" относится к жидкостной хроматомасс-спектрометрии с ионизацией электроспреем; "МС" относится к масс-спектрометрии; "MeOH" относится к метанолу; "МТБЭ" относится к метил-трет-бутиловому эфиру; "nBuLi" относится к n-бутиллитию; "нм" относится к нанометру или нанометрам; "ЯМР" относится к ядерному магнитному резонансу; "OAc" относится к ацетату; "фунт/кв. дюйм" относится к фунтам на квадратный дюйм; "комн. т-ра" относится к комнатной температуре или к температуре окружающей среды; "СКО" относится к сильному катионообмену; "СЖХ" относится к сверхкритической жидкостной хроматографии; "SNAg" относится к нуклеофильному ароматическому замещению; "ТЭА" относится к триэтиламину; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; "t_R" относится к времени удерживания"; и "мас./мас." относится к мас-са/массовым отношениям в растворе.

Соединения формулы I можно синтезировать так, как показано на следующих схемах.

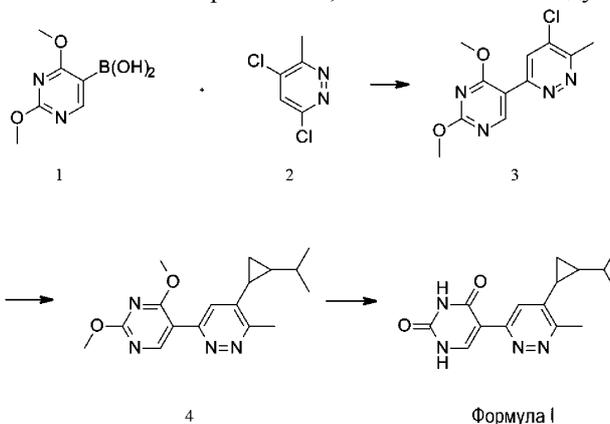


Схема 1

На схеме 1 показано получение соединений формулы I. Используя общеизвестные условия реакции Сузуки, доступную в продаже (2,4-диметоксипиримидин-5-ил)бороновую кислоту 1 можно конденсировать с 4,6-дихлор-3-метилпиридазином. Можно выполнить следующее сочетание Сузуки хлор-фрагмента соединения 3 с транс-циклопропилборонатом, замещенным соответствующим образом, с получением соединения 4. Опытным специалистам понятно, что энантиомеры соединения 4 можно разделить с помощью технологий хирального разделения, известных в данной области техники. Соединения формулы I могут быть получены посредством снятия защитных метокси-групп в соединении 4 в ряде условий деметилирования, подробно описанных в известном уровне техники.

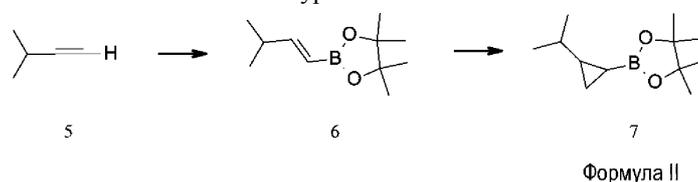


Схема 2

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

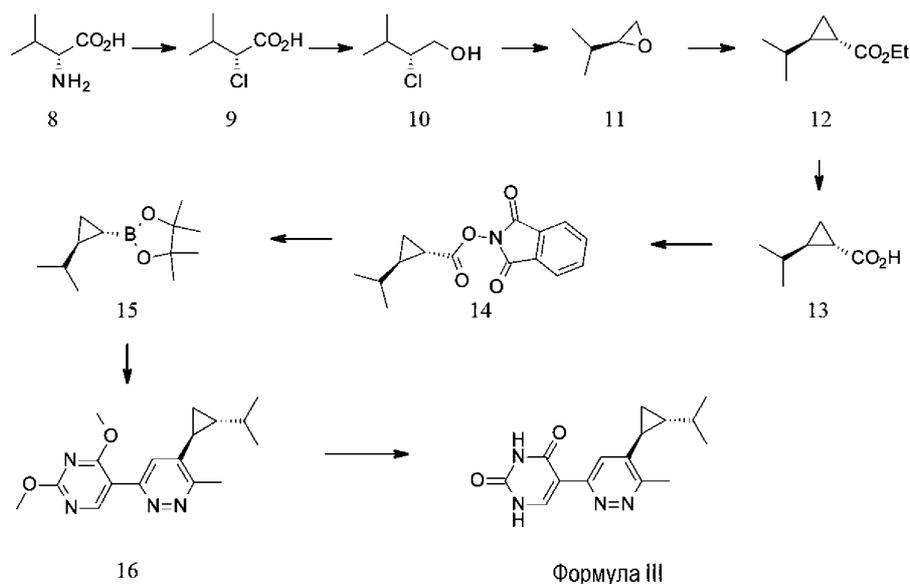


Схема 3

На схеме 3 показан хиральный синтез соединений формулы III. Диазотирование соответствующим образом замещенной аминокислоты 8 в модифицированных условиях Зандмейера (радикальное S_NAr), приводящее к образованию соединения 9, известно в данной области техники. Последующее восстановление до спирта 10 можно провести с использованием ряда восстановительных агентов, известных в данной области техники, включая гидриды алюминия и диборан в качестве восстановительных агентов. Циклизация до хирального эпоксида 11 в щелочных условиях подробно описана в известном уровне техники. Можно использовать стереоселективную реакцию Хорнера-Вадсворта-Эммонса с обработкой хирального эпоксида 11 пригодным фосфонатным сложным эфиром (например, этил-2-диэтоксифосфилацетатом или триэтилфосфоацетатом) и пригодным основанием (например, алкиллитием, алкоксидами металлов или гидридами металлов) для получения транс-циклопропанового производного 12 (см., например, L. Delhaye, A. Merschaert, P. Delbeke, W. Brione, *Org. Proc. Res. & Dev.*, 2007, 11, 689-692). Гидролиз соединения 12 до соответствующей кислоты 13 можно осуществлять в широком диапазоне основных условий, подробно описанных в данной области техники. Последующее связывание кислоты 13 с соответствующим образом замещенным N-гидроксифталимидом подробно описано в данной области техники с применением пригодного агента для активации кислоты, например карбонилдиимдазола, в присутствии слабого ненуклеофильного основания, с получением соединения 14. Декарбоксилирующее борилирование N-гидроксифталимидного сложного эфира 14 можно осуществлять в различных условиях, известных в данной области техники, в том числе в присутствии катализатора на основе переходного металла (например, по реакции Сузуки-Мияура), в фотолитических условиях, или посредством реакций с переносом одного электрона, включая, например, образование комплекса N-гидроксифталимидного сложного эфира с дибором по реакции радикальной конденсации, ускоряемой радикалом пиридин-бора, с получением транс-циклопропанбороната 15 (см., например, W.-M. Cheng, S. Rui, B. Zhao, W.-L. Xing, Y. Fu., *Org. Lett.*, 2017, 19, 4291-4294). Связывание бороната 15 с арилхлоридом 4 и последующее деметилирование можно осуществлять таким же образом, как описано на схеме 1, с получением типов хиральных соединений формулы III.

Способы получения и примеры

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

труда доступны или могут быть легко синтезированы специалистами в данной области техники. Следует понимать, что приведенные ниже способы получения и примеры представлены с целью иллюстрации, но не ограничения, и что специалисты в данной области техники могут делать различные модификации.

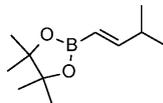
ЖХ-ЭР/МС проводили на жидкостной хроматографической системе Agilent HP1100. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме) проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ РН 1100.

Условия для ЖХ-МС (низкий рН): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1×50 мм, 3,0 мкм; градиент: 5-100% В за 3 мин, затем 100% В в течение 0,75 мин, температура колонки: 50±10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% НСООН, растворитель В: АСН с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 214 нм. Альтернативные условия для ЖХ-МС (высокий рН): колонка: колонки WATERSTM XTERRA® MS C-18, 2,1×50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5% растворителя А в течение 0,25 мин, градиент от 5 до 100% растворителя В за 3 мин и 100% растворителя В в течение 0,5 мин или от 10 до 100% растворителя В за 3 мин и при 100% растворителя В в течение 0,75 мин; температура колонки: 50±10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; растворитель А: 10 мМ NH₄НСО₃ рН 9; растворитель В: АСН; длина волны: 214 нм.

Препаративную обращенно-фазовую хроматографию проводили на системе ЖХ-ЭР/МС Agilent 1200, оснащенной масс-спектрометром с масс-селективным детектором и автоматическим пробоотборником Leap. Методы при высоком рН осуществляли на колонке 75×30 мм PHENOMENEX® GEMINI®-NX с размером частиц 5 мкм с защитой 10×20 мм. Скорость потока 85 мл/мин. В качестве элюента использовали 10 мМ бикарбонат аммония (рН 10) в АСН.

Спектры ЯМР записывали на ЯМР спектрометре Bruker AVIII HD при 400 МГц, образцы получали в виде растворов в CDCl₃ или (CD₃)₂SO, результаты записывали в м.д., используя остаточный растворитель [CDCl₃, 7,26 м.д.; (CD₃)₂SO, 2,50 м.д.] в качестве эталонного стандарта. При записи мультиплетности пиков могут быть использованы следующие сокращения: с (синглет), д (дублет), т (триплет), к (квартет), м (мультиплет), шс (широкий синглет), дд (дублет дублетов), дт (дублет триплетов). Константы спин-спинового взаимодействия (J), в случае их указания, записаны в герцах (Гц).

Способ получения 1. 4,4,5,5-Тетраметил-2-[(Е)-3-метилбут-1-енил]-1,3,2-диоксаборолан.

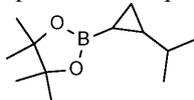


В течение 5 мин по каплям добавляли пинаколборан (9,5 мл, 64 ммоль) к ледяному 3-метилбут-1-ину (4,91 г, 72,0 ммоль). Закрывали емкость для работы под давлением, нагревали до комнатной температуры и перемешивали 18 ч. Добавляли хлорид-гидрид бис(циклопентадиенил)циркония (IV) (2,0 г, 7,4 ммоль) и ТЭА (1,1 мл, 7,9 ммоль). Закрывали емкость для работы под давлением, помещали на масляную баню при 60°C и перемешивали 10 мин. Охлаждали полученный красный раствор до комнатной температуры в течение 2,5 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (200 мл), промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (100 мл), насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали через слой силикагеля (150 мл), промывали силикагель ДХМ (700 мл) и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (11,5 г, 82%).

ЭР/МС (m/z): 196 (M+H).

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,03 (д, J= 6,7 Гц, 6H), 1,29 (с, 12H), 2,37 (м, 1H), 5,40 (дд, 1H), 6,64 (дд, 1H).

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

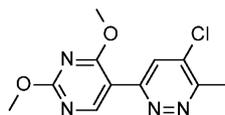


По частям добавляли N-нитрозо-N-метилмочевину к ледяной двухфазной смеси Et₂O (70 мл) и водного раствора KOH (30,5 г, 435 ммоль, 70 мл H₂O). Перемешивали до растворения твердого вещества (<5 мин). Пипеткой переносили полученный раствор диазометана в быстро перемешиваемую ледяную суспензию Pd(OAc)₂ (237 мг, 1,05 ммоль) и 4,4,5,5-тетраметил-2-[(Е)-3-метилбут-1-енил]-1,3,2-диоксаборолана (4,00 г, 20,4 ммоль) в Et₂O (70 мл). После завершения добавления нагревали реакционную смесь до комнатной температуры, фильтровали через диатомовую землю и концентрировали фильтрат в вакууме. Растворили полученный остаток в ДХМ, фильтровали через слой силикагеля (25 г) и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (4,32 г, >99%).

ЭР/МС (m/z): 210 (M+H).

¹H ЯМР (CDCl₃) δ -0,35 (м, 1H), 0,45 (м, 1H), 0,65 (м, 1H), 0,78 (м, 1H), 0,98 (м, 7H), 1,23 (с, 12H).

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



В колбе для работы под давлением смешивали 2,4-диметокси-5-пиримидинилбороновую кислоту (6,75 г, 36,7 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпиридазин (5,98 г, 36,7 ммоль), [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (0,55 г, 0,73 ммоль), Cs₂CO₃ (29,9 г, 91,8 ммоль) в 4:1 смеси 1,4-диоксан/Н₂O (151 мл). Откачивали воздух и закачивали N₂. Закрывали емкость и нагревали при 70°C в течение 3 ч. Фильтровали остаток через диатомовую землю и промывали EtOAc. Промывали органическую смесь водой, затем насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄ и выпаривали досуха. Очищали полученный черный остаток хроматографией на силикагеле, используя 330 г колонку REDISEP® с градиентом 0-30% ДХМ/(33% MeOH в ДХМ) за 15 мин при скорости потока 200 мл/мин. с получением указанного в заголовке соединения (6,2 г, 63%) после выпаривания хроматографических фракций.

ЭР/МС (m/z) (³⁵Cl/³⁷Cl) 267/269 [M+1]⁺.

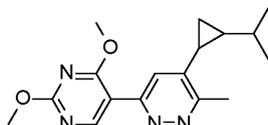
Н ЯМР (d₆-DMCO δ 2,74 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 4,03 (с, 3H), 8,20 (с, 1H), 8,87 (с, 1H).

Альтернативная методика для способа получения 3.

Поток азота пропускали через смесь (2,4-диметоксипиримидин-5-ил)бороновой кислоты (85 г, 439 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпиридазина (75 г, 437 ммоль) и Cs₂CO₃ (358 г, 1099 ммоль) в 1,4-диоксане (1175 мл) и Н₂O (340 мл) в течение 5 мин. Добавляли [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (6,6 г, 8,7 ммоль) и перемешивали полученную смесь при 75°C в течение 16 ч. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры, фильтровали смесь через диатомовую землю и промывали осадок на фильтре EtOAc. Разделяли полученные слои и дважды промывали органическую фазу насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. К полученному остатку добавляли воду (500 мл), перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре и отфильтровывали полученное твердое вещество. Промывали собранное твердое вещество Н₂O и сушили под вакуумом в течение 16 ч с получением требуемого соединения (70 г, 54%) в виде коричневого твердого вещества.

ЭР/МС (m/z) (35Cl/37Cl) 267/269 [M+1]⁺.

Способ получения 4. транс-5-[2-Изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин.

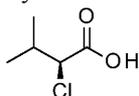


Объединяли 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин (1,97 г, 7,39 ммоль), рац-транс-2-[2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (3,32 г, 15,8 ммоль), бис(дитрет-бутил(4-диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий (II) (1,35 г, 1,85 ммоль), 1,4-диоксан (37 мл) и 1 М водный раствор Na₂CO₃ (18 мл, 18 ммоль). Продуvalи реакционную емкость N₂ и нагревали до 90°C в течение 18 ч. Охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc (150 мл) и разделяли слои. Органический слой последовательно промывали 1 М водным раствором Na₂CO₃, насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя градиентом 60-100% EtOAc/ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде по существу рацемической смеси изомеров (1,48 г, 64%) после выпаривания хроматографических фракций.

Изомеры подвергали очистке СЖХ (колонка: PHENOMENEX® LUX® Cellulose-4, 4,6×150 мм; изократическое элюирование 40% MeOH/CO₂; скорость потока: 5 мл/мин, УФ 250 нм) с получением 647 мг изомера 1: t_R=2,56 мин и 647 мг изомера 2: t_R=3,75 мин.

ЭР/МС (m/z): 315 (M+H).

Способ получения 5. (2S)-2-Хлор-3-метилбутановая кислота.

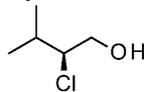


Охлаждали раствор L-валина (286 г, 2,44 моль) и 5 М водного раствора HCl (3,25 л, 16,3 моль) при 0°C. По каплям добавляли 4 М водный раствор NaNO₂ (1 л, 4 моль) за 2 ч, поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Перемешивали реакционную смесь в течение 2 ч, нагревая до комнатной температуры, и перемешивали еще 16 ч при комнатной температуре. В течение 30 мин по частям добавляли Na₂CO₃ (242 г, 2,28 моль). Полученный раствор экстрагировали МТБЭ (3×1000 мл), промывали объединенные органические экстракты насыщенным водным раствором NaCl (500 мл), органические экстракты сушили над MgSO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали вакуумной перегонкой (15 мбар (1,5 кПа)/140°C) с получением указанного в заголовке соединения (248 г, 68%) в виде масляни-

стого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 1,1 (дт, $J=6,6, 2,6$ Гц, 6H), 2,34-2,42 (м, 1H), 4,19-4,23 (м, 1H), 10,0-12,0 (шс, 1H).

Способ получения 6. (2S)-2-Хлор-3-метилбутан-1-ол.



Охлаждали раствор (2S)-2-хлор-3-метилбутановой кислоты (137 г, 1 моль) в 2-метилтетрагидрофуране (500 мл) до 0°C . По каплям добавляли 2,3 М раствор ЛАН в метилтетрагидрофуране (480 мл, 1,1 моль) в течение 2,5 ч, поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C . Нагревали до комнатной температуры и перемешивали смесь 1 ч при комнатной температуре и 1 ч при 50°C . Охлаждали реакционную смесь до 0°C и последовательно и медленно добавляли H_2O (1,48 мл), 15% водный раствор NaOH (1,48 мл) и H_2O (4,46 мл). Оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры, фильтровали через слой диатомовой земли и выпаривали растворитель в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (110 г, 81%) в виде бесцветного маслянистого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 0,97- 1,1 (м, 6H), 1,94-2,18 (м, 1H), 2,60-3,09 (шс, 1H), 3,71-3,78 (м, 1H), 3,80-3,85 (м, 1H), 3,90-3,96 (м, 1H).

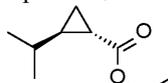
Способ получения 7. (2R)-2-Изопропилоксиран.



Охлаждали раствор KOH (195 г, 3,48 моль) в H_2O (195 мл) до 0°C и в течение 20 мин добавляли неразбавленный (2S)-2-хлор-3-метилбутан-1-ол (110 г, 801 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C . Оставляли реакционную смесь нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь очищали вакуумной перегонкой при 100 мбар (10 кПа), нагревая с 23 до 50°C , с получением указанного в заголовке соединения (47 г, 64%) в виде бесцветного маслянистого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 0,98 (д, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,05 (д, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,51 (о, $J=6,9$ Гц, 1H), 2,52-2,54 (м, 1H), 2,70-2,75 (м, 2H).

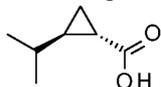
Способ получения 8. Этил-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилат.



2,5 М Раствор $n\text{BuLi}$ в гексанах (310 мл, 780 ммоль) по каплям в течение 25 мин добавляли к раствору этил-2-диэтоксифосфилацетата (153 мл, 772 ммоль) в 1,4-диоксане (870 мл), охлажденному на ледяной бане (внутренняя температура: 8°C). Нагревали до комнатной температуры и перемешивали 40 мин. Через канюлю переносили раствор в колбу для работы под давлением объемом 3 л и добавляли (2R)-2-изопропилоксиран (70 г, 772 ммоль) в 1,4-диоксане (180 мл). Перемешивали реакционную смесь при 150°C при давлении 50 фунт/кв. дюйм (345 кПа) в течение 14 ч. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и добавляли H_2O (700 мл). Разделяли слои и повторно экстрагировали водную фазу МТБЭ (2×500 мл). Объединяли органические фазы, промывали насыщенным водным раствором NaCl (2×350 мл), сушили над MgSO_4 и концентрировали в вакууме с получением неочищенного указанного в заголовке соединения (107,7 г, >99%) в виде желтого маслянистого вещества, пригодного для дальнейшего использования без дополнительной очистки.

ГХ-МС (m/z): 156 (M+).

Способ получения 9. (1S,2R)-2-Изопропилциклопропанкарбоновая кислота.

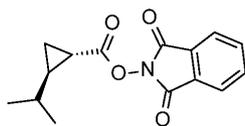


Перемешивали смесь этил-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилата (107,7 г, 482,6 ммоль) в 1,4-диоксане (800 мл), содержащем 25% водный раствор NaOH (800 мл), при 100°C в течение 7 ч. Охлаждали смесь до комнатной температуры, добавляли воду (300 мл), экстрагировали МТБЭ (2×500 мл) и удаляли органическую фазу. Водную фазу подкисляли 37% водным раствором HCl (приблизительно 500 мл) до $\text{pH} \sim 1-2$.

Подкисленную водную смесь экстрагировали МТБЭ (2×600 мл), органический слой промывали насыщенным водным раствором NaCl , сушили над MgSO_4 и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (54,2 г, 75%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 0,81-0,86 (м, 1H), 1,01 (дт, $J=5,9, 3,7$ Гц, 6H), 1,04-1,13 (м, 1H), 1,20-1,24 (м, 1H), 1,28-1,37 (м, 1H), 1,39-1,44 (м, 1H).

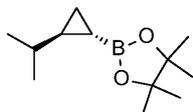
Способ получения 10. (1,3-Диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилат.



Перемешивали суспензию (1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоновой кислоты (54,2 г, 359 ммоль), 2-гидроксиизоиндолин-1,3-диона (59,8 г, 359 ммоль) и DMAP (4,44 г, 35,9 ммоль) в ДХМ (690 мл) при 0°C. По каплям добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (50,4 г, 395 ммоль), нагревали до комнатной температуры и перемешивали полученную реакционную смесь в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли H₂O (600 мл) и разделяли фазы. Водную фазу экстрагировали ДХМ (2×300 мл), объединяли органические фазы, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали. Полученный твердый остаток очищали хроматографией на силикагеле, элюируя 100% ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения (96 г, 88%) в виде бледно-желтого твердого вещества после выпаривания хроматографических фракций.

ЭР/МС (m/z): 274 (M+1).

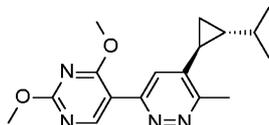
Способ получения 11. 2-[(1S,2S)-2-Изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан.



Пропускали поток азота через раствор (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-изопропилциклопропанкарбоксилата (96 г, 316 ммоль) и бис(пинаколато)дибора (160 г, 630 ммоль) в EtOAc (480 мл) в течение 15 мин. Перемешивали смесь при 85°C и по каплям добавляли этилизоникотинат (24,38 г, 157 ммоль) за 10 мин. Полученную смесь перемешивали при 85°C в течение 16 ч. Полученную суспензию охлаждали, фильтровали и удаляли твердое вещество, и выпаривали коричневый фильтрат при пониженном давлении. Неочищенный остаток фильтровали через слой силикагеля, элюируя 2% смесью EtOAc/гексаны. Из фильтрата удаляли растворитель и повторно очищали полученный остаток хроматографией на силикагеле, элюируя 3% смесью EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (25,3 г, 38%) в виде бесцветного маслянистого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ -0,33-(-0,38) (м, 1H), 0,42-0,47 (м, 1H), 0,63-0,67 (м, 1H), 0,75-0,82 (м, 1H), 0,89-1,02 (м, 1H), 0,98 (м, 6H), 1,24 (с, 12H).

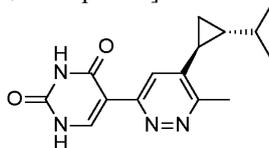
Способ получения 12. 5-[5-[(1S,2R)-2-Изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин.



Смешивали 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин (19,1 г, 70,6 ммоль), K₃PO₄ (45,9 г, 212 ммоль), 1,4-диоксан (300 мл) и H₂O (75 мл) и дегазировали смесь с помощью N₂ в течение 10 мин. Добавляли [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (7,98 г, 10,6 ммоль). Еще 2 мин пропускали газообразный азот и одной порцией добавляли 2-[(1S,2S)-2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (22,2 г, 106 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли H₂O и экстрагировали EtOAc. Органический слой отделяли, сушили над безводным MgSO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя 85% смесью гексаны/EtOAc, с выделением указанного в заголовке соединения (21,5 г, 92%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета после удаления растворителя из хроматографической фракции. Маслянистое вещество затвердевало при выстаивании при комнатной температуре до грязновато-белого твердого вещества.

ЭР/МС (m/z): 315 (M+1).

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



Изомер 1 транс-5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидина (628 мг, 2,00 ммоль) растворяли в MeOH (3 мл). Добавляли 1 М водный раствор HCl (5 мл) и нагревали до 70°C в течение 3 ч. Охлаждали до комнатной температуры, загружали реакционную смесь на СКО колонку, промытую MeOH (20 г, Silicycle SILIABOND-п-толуолсульфоновая кислота), промывали СКО колонку MeOH (140 мл) и элюировали требуемый продукт, используя 2 М NH₃/MeOH (140 мл).

Концентрировали фракции NH_3/MeOH с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества кремового цвета (546 мг, 95%).

ЭР/МС (m/z): 287 (M+H).

^1H ЯМР (d_6 -DMSO) δ 0,99 (м, 9H), 1,24 (м, 1H), 1,81 (м, 1H), 2,72 (с, 3H), 7,67 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 11,43 (шс, 2H).

Рентгеновская порошковая дифракция кристаллических форм.

Соединение в виде свободного основания растворяли в метаноле, перемешивали при 50°C в течение 1 ч и оставляли остывать до комнатной температуры, при этом происходила его кристаллизация из раствора. Затем твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией и недолго сушили под вакуумом при 70°C .

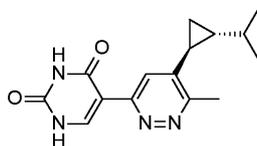
Диаграммы РПД кристаллических веществ снимали на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavor, оснащенном источником излучения $\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$) и датчиком Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до $40^\circ 2\theta$ с шагом $0,008^\circ 2\theta$ и скоростью сканирования $0,5$ с/шаг и с дивергенцией $0,6$ мм, фиксированной противорассеивающей щелью $5,28$ мм и щелью детектора $9,5$ мм. Сухой порошок выкладывали на кварцевый держатель образца и при помощи предметного стекла обеспечивали гладкую поверхность. Дифрактограммы кристаллической формы снимали при температуре и относительной влажности окружающей среды. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и структура кристалла. При наличии эффекта предпочтительной ориентации, интенсивности пиков являются переменными, но положения характеристических пиков полиморфа не меняются. См., например, Фармакопею США № 23, национальный формуляр № 18, с. 1843-1844, 1995. Дополнительно, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной формы кристалла угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков смещаются из-за изменения температуры или влажности, при которой анализируется образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 2\theta$ учитывает эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков (в единицах $^\circ 2\theta$), как правило, более выраженных пиков. Диаграммы дифракции кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, корректировали по стандартным пикам NIST 675 при $8,853$ и $26,774^\circ 2\theta$.

Твердофазный ^{13}C ЯМР (^{13}C ssNMR).

^{13}C Спектры ЯМР с кросс-поляризацией/вращением под магическим углом (твердотельный ЯМР или ssNMR) получены с использованием ЯМР-спектрометра Bruker Avance II 400 МГц, работающего на частоте углерода $100,622$ МГц и частоте протонов $400,131$ МГц и оборудованного 4-миллиметровым двойным резонансным датчиком Bruker. Подавление боковой полосы TOSS используется вместе с перекрестной поляризацией с использованием развязки SPINAL64 и импульса CP H-ядра в форме RAMP 100. Параметры сбора данных следующие: ширина импульса протонного радиочастотного излучения под углом 90° $2,6$ мкс, время контакта $2,0$ мс, время повторения импульсов 3 с, частота MAS 10 кГц, ширина спектра 30 кГц, время сбора данных 34 мс и количество сканов 18661 . Химические сдвиги соотносили с адамантаном ($\delta=29,5$ м.д.) в отдельном эксперименте.

Способ получения 13.

Кристаллическая форма 1: 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион (безводный).



Перемешивали суспензию 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметокси-пиримидина ($21,5$ г, $65,6$ ммоль) и 1 М водного раствора HCl (165 мл, 135 ммоль) при 45°C в течение 16 ч. Охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали МТБЭ. Удаляли органическую фазу, а к водной фазе добавляли 2 М водный раствор K_2HPO_4 до $\text{pH}\sim 6$ (приблизительно 150 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Отфильтровывали и собирали полученное твердое вещество, промывали водой и сушили в вакуумной печи при 45°C в течение 16 ч с получением указанного в заголовке соединения ($14,3$ г, 76%) в виде белого твердого вещества.

ЭР/МС (m/z): 287 (M+1).

Полученный образец безводной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 1) характеризуется рентгеновской дифрактограммой при использовании излучения $\text{CuK}\alpha$, имеющей дифракционные пики (значения 2 -тета), описанные в табл. 1 ниже. В частности, диаграмма содержала пик при $4,7^\circ$ в комбинации с одним или более пи-

ками, выбранными из группы, состоящей из 11,7, 15,8 и 16,0° с допуском для углов дифракции 0,2°.

Таблица 1

Пики рентгеновской порошковой дифракции безводной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 1)

Пик	Угол (2-тета °) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от самого интенсивного пика)
1	4,7	100%
2	11,7	6%
3	15,8	6%
4	16,0	10%
5	26,8	5%
6	27,2	4%

Репрезентативные резонансы ^{13}C ssNMR для безводной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 1) включают 16,6, 18,3, 20,7, 22,1, 23,9, 25,4, 26,6, 27,6, 28,1, 28,9, 30,2, 31,2, 32,2, 38,6, 39,7, 41,2, 43,1, 109,3, 111,0, 112,0, 124,4, 128,2, 130,7, 145,1, 146,3, 150,1, 151,0, 153,4, 156,7, 157,6, 158,6, 159,3, 160,7, 163,4, 165,9, 167,0, 169,4 и 170,2 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

Способ получения 14.

Кристаллическая форма 2: 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион (десольватированный/безводный).

Добавляли кристаллическую форму 1, 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион (15,4 кг, 53,8 моль), к воде (770 л) в реакторе из хастеллоя объемом 3500 л при комнатной температуре. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 19 ч. Отфильтровывали и собирали полученное твердое вещество, промывали водой и сушили в вакуумной печи при 40°C в течение 3 дней с получением указанного в заголовке соединения (13,8 кг, 89%) в виде белого твердого вещества. Чистота по ВЭЖХ: 99,8%.

Наблюдали семейство родственных кристаллических форм, полученных из образца десольватированной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 2). Один из членов семейства характеризуется рентгеновской дифрактограммой при использовании излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2-тета), описанные в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Пики рентгеновской порошковой дифракции десольватированной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 2)

Пик	Угол (2-тета °) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от самого интенсивного пика)
1	4,3	100
2	6,4	56
3	9,6	13
4	11,0	11
5	11,6	36

Репрезентативные резонансы ^{13}C ssNMR для десольватированной (безводной) кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (форма 2) включают 17,2, 18,9, 21,1, 22,5, 24,4, 26,7, 27,8, 28,7, 29,7, 39,7, 41,3, 45,5, 50,1, 110,7, 111,7, 112,4, 122,0, 125,0, 126,1, 129,1, 143,6, 144,8, 146,2, 147,2, 149,9, 151,1, 153,0, 155,5, 157,2, 159,0, 160,6, 161,4, 162,7, 164,8, 167,0, 168,3 и 170,4 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

Другие члены семейства характеризуются рентгеновской дифрактограммой с использованием излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2-тета) при более 4,3 и до 5,5° в сочетании с одним или более пиками 4,7, 6,4, 9,3, 11,0, 11,6, 18,4 и 27,9° с допуском на углы дифракции 0,2°.

Способ получения 15.

Кристаллическая форма 3: 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион (полуидрат).

Добавляли 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметокси-пиримидин (316 г, 0,92 моль) к 1 М водному раствору HCl (2,6 л, 2,6 моль) в 5-литровой колбе при комнатной температуре. Полученную суспензию нагревали до 45°C и перемешивали при этой температуре в течение 16 ч. Охлаждали до комнатной температуры и добавляли 2 М водный раствор K₂HPO₄ до pH~6. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Отфильтровывали и собирали полученное твердое вещество, сушили в вакуумной печи при 40°C в течение 3 дней с получением указанного в заголовке соединения (250 г, 92%) в виде белого твердого вещества. Чистота по ВЭЖХ: 99%.

Полученный образец полуидратной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона (Форма 3) характеризуется рентгеновской дифрактограммой при использовании излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2-тета), описанные в табл. 3 ниже. В частности, диаграмма содержала пик при 5,0° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 16,4, 17,8 и 26,6° с допуском для углов дифракции 0,2°.

Таблица 3

Пики рентгеновской порошковой дифракции полуидратной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона (форма 3)

Пик	Угол (2-тета °) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от самого интенсивного пика)
1	5,0	100
2	16,4	15
3	17,8	10
4	26,6	23
5	28,8	8

Репрезентативные резонансы ¹³C ssNMR для полуидратной кристаллической формы 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона (форма 3) включают 16,5, 18,9, 19,6, 20,4, 22,6, 23,5, 24,4, 26,0, 27,4, 28,3, 30,0, 30,9, 34,6, 38,4, 40,5, 110,2, 110,8, 124,1, 126,8, 130,4, 131,2, 146,0, 147,1, 150,4, 151,2, 153,4, 157,1, 157,7, 158,3, 159,6, 163,1, 166,2 и 169,7 и м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

Способ получения 16.

Преобразование кристаллической формы 2 в кристаллическую форму 1.

Добавляли кристаллическую форму 2, 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион (5,0 кг, 17,4 моль) к смеси ТГФ (100 л) и воды (10 л). Полученный раствор концентрировали до 10-15 л при пониженном давлении ниже 50°C. Загружали ТГФ (5 л) и воду (60 л), нагревали до 50-60°C и перемешивали в течение 2-4 ч. Охлаждали до 20-25°C и перемешивали в течение 1-2 ч. Фильтровали и собирали полученное твердое вещество, промывали водой (10 л) и сушили с получением указанного в заголовке соединения (4,2 кг, 84%) в виде грязно-белого твердого вещества. Чистота по ВЭЖХ: 99,4%.

Масс-спектрометрия для определения аденозина и очистка аденозина.

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

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

3000 мс.

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

Биохимический анализ человеческого CD73.

Целью данного анализа является идентификация и характеристика активности 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона против фермента CD73. Добавляли реакционные смеси (20 мкл), содержащие 2 мкМ аденозинмонофосфата (Sigma, № 01930), 10 мМ Tris pH 7,5, 100 мМ NaCl, 0,01% BSA, 0,2 мМ октилглюкозид и 50 пМ белок CD73, в 384-луночный планшет (Nunc, №264573). Через 30 мин инкубации при комнатной температуре останавливали реакцию посредством добавления 20 мкл стоп-раствора, содержащего 2% муравьиной кислоты и 10 мкМ ¹³C5-аденозина (рибозы с меткой ¹³C5) (Cambridge Isotope Laboratories, №CLM-3678-0), затем добавляли 40 мкл dH₂O. Уровни аденозин- и аденозинрибозы-¹³C5 (внутреннего стандарта) определяли с помощью масс-спектрометрии, как описано выше. Для количественной оценки каждой реакции использовали отношение сигналов (интегрирование пика аденозина/интегрирование пика внутреннего стандарта аденозина). Процентное ингибирование рассчитывали по уравнению % ингибирование=100×[1-(X-MIN)/(MAX-MIN)], где X равен отношению сигналов в лунке, MAX равен среднему отношению сигналов контрольного образца с ДМСО, а MIN равен отношению сигналов активности фермента в присутствии >10X IC₅₀ известного конкурентного ингибитора. Для проведения скрининга каждое соединение испытывали в концентрации 50 мкМ в 1% ДМСО. Определяли IC₅₀ для 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона, испытывая каждое соединение в 10 концентрациях от 0,0025 до 50 мкМ (используя схему разбавления 1:3).

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

Анализ механизма мышиноного CD73.

Целью данного анализа является оценка 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона в отношении подавления ими активности мышиноного фермента CD73. Анализ проводили так, как описано выше для биохимического анализа человеческого CD73, за исключением того, что использовали 3 мкМ АМФ и 50 пМ мышинный фермент CD73.

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

Анализ человеческих клеток Calu6.

Целью данного анализа является испытание 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона против CD73 в клеточном анализе. Клетки Calu6 (1500 клеток/лунка) выращивали в 96-луночном планшете, покрытом поли-D-лизинном (BD, № 356640), содержащем 100 мкМ среды (MEM (Gibco, № 11095-072)+1% пирувата натрия (Gibco, № 11360-070)+1% NEAA (Gibco, № 11140-050)+10% FBS (HyClone, №SH30071)). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂. Клетки дважды промывали аналитическим буфером (10 мМ Tris-HCl pH 7,2, 10 мМ D-глюкозы, 1 мМ KCl, 125 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂) (90 мкл/лунка). Затем в каждую лунку добавляли 90 мкл аналитического буфера, затем добавляли 10 мкл на лунку АМФ и предварительной смеси соединения (50 мкМ АМФ, различные концентрации 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона в 1% ДМСО). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем удаляли 10 мкл надосадочного раствора из каждой лунки и помещали в новый планшет, затем добавляли 20 мкл стоп-раствора (2% муравьиной кислоты, 1,2 мкМ аденозинрибозы-¹³C5 (Cambridge Isotope Laboratories, № CLM-3678-0) и 90 мкл ddH₂O для масс-спектроскопического анализа. Уровни аденозин- и аденозинрибозы-¹³C5 (внутреннего стандарта) определяли с помощью масс-спектрометрии (Agilent RapidFire), как описано выше для биохимического анализа человеческого CD73. Процентное ингибирование также рассчитывали так, как описано выше.

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

Ex vivo анализ ингибирования мишени.

Целью данного анализа является испытание 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона против мышиноного CD73 в крови мышей в ex vivo анализе. Животным (6 на группу) перорально вводили дозу каждого соединения, составленного в 20% HPBCD (2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), pH 2, по достижении объема опухоли приблизительно 400 мм³. После лечения собирали кровь в гепариновые пробирки и использовали для ex vivo анализа превращения ¹³C10-¹⁵N5-АМФ в меченый аденозин, инозин и гипоксантин, как описано для ex vivo анализа, с использованием цельной крови, взятой у животных, подверженных лечению посредством перорального введе-

ния дозы соединения.

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

Таблица 4

Ингибирование превращения АМФ в аденозин

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

* Статистическая значимость.

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

In vivo анализ ингибирования человеческого CD73 в опухоли Calu6.

Целью данного анализа является испытание 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона против человеческого CD73 в ксенотрансплантатных опухолях, полученных из раковых клеток Calu6 человека в анализе in vivo ингибирования мишени. Клетки Calu6 (ATCC) выращивали в среде HBSS с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Собирали субконфлюэнтные клетки с помощью трипсина и дважды промывали питательной средой без сыворотки. Инициировали рост подкожной опухоли посредством инъекции 5×10^6 клеток в 1:1 смеси HBSS и MATRIGEL® (BD Biosciences, Франклин Лэйкс, штат Нью-Джерси) в заднюю боковую область "голых" мышей (The Harlon Laboratory). По достижении среднего объема опухоли приблизительно 400-500 мм³, животных случайным образом разделяли по размеру опухоли и массе тела и помещали в соответствующие указанные экспериментальные группы. После лечения собирали образцы опухоли (50-80 мг каждая) и перерабатывали в 1 мл ледяного экстракционного буфера, содержащего внутренние стандарты, как описано ниже.

В ступку для предварительного охлаждения добавляли полоску фольги и жидкий N₂. Каплю опухолевой ткани помещали на полоску фольги и добавляли жидкий N₂. Другую полоску фольги помещали поверх опухолевой ткани и отбивали пестиком до полного измельчения опухоли. 50-100 мг опухолевой ткани помещали в пробирки (Fishers Scientific, кат. № 02-681-302) и ставили на сухой лед. В пробирки добавляли одну гранулу металла (Qiagen, кат. № 69989) и 1 мл 80% метанола, содержащего внутренние стандарты ¹³C₅-аденозина, ¹³C₅-АМФ, ¹⁵N₅-ГТФ, ¹⁵N₄-инозин-5'-монофосфата и ¹³C-¹⁵N-гипоксантина (Cambridge Isotope Lab и Cayman Chemical), и хранили образцы при -80°C до использования для анализа ЖХ/МС.

Также собирали кровь в гепариновые пробирки и использовали для ex vivo анализа превращения ¹³C₅-¹⁵N₅-АМФ в меченый аденозин, инозин и гипоксантин, как описано для ex vivo анализа, с использованием цельной крови, взятой у животных, подверженных лечению посредством перорального введения дозы соединения.

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

Таблица 5

Ингибирование превращения АМФ в аденозин

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

* Статистическая значимость.

ЖХ/МС анализ для измерения активности CD73 в сыворотке человека Свежую кровь здорового че-

ловека центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин при комнатной температуре и собирали верхнюю фракцию, содержащую сыворотку. Собранную сыворотку (25 мкл/лунка) переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками (DWP, Analytical Sales & Services Inc., кат. № 968820), содержащими различные концентрации 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона и фиксированную концентрацию левамизола (1500 мкМ). После инкубации на льду в течение 60 мин в каждую лунку на планшете добавляли $^{13}\text{C}5$ - $^{15}\text{N}5$ -АМФ (50 мкМ) и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем планшет ставили на сухой лед с добавлением 200 мкл на лунку 17,3 ТСА, после чего встряхивали при 26 к/с в течение 3 мин на приборе для встряхивания планшетов (Qiagen). Затем планшет центрифугировали при 2940 g в течение 20 мин при 4°C. После центрифугирования переносили 100 мкл на лунку надосадочного раствора из каждого раствора в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками и смешивали с 18,4 мкл на лунку 2,5 М Na_2CO_3 на льду, затем добавляли 200 мкл экстракционного раствора, содержащего внутренний стандарт (внутр. ст.: $^{13}\text{C}5$ -АМФ, $^{13}\text{C}5$ -аденозин, $^{13}\text{C}5$ -гипоксантин и $^{15}\text{N}4$ -инозин). После дополнительного центрифугирования при 2940 g в течение 20 мин при 4°C использовали 200 мкл на лунку надосадочного раствора для анализа $^{13}\text{C}10$ - $^{15}\text{N}5$ -аденозина, $^{13}\text{C}10$ - $^{15}\text{N}5$ -инозина и $^{15}\text{N}5$ -гипоксантина с помощью ЖХ/МС, как описано выше. Для расчета ЕС50 делали поправку концентраций 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона в сыворотке на несвязанную фракцию (%), полученную в компьютерных моделях или экспериментально.

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

Таблица 6

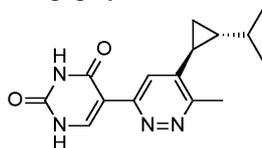
5-[5-[(1S,2R)-2-Изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион (мкМ)	Ингибирование (%)
4,6800	76,9
1,5600	71,1
0,5200	56,8
0,1733	39,6
0,0578	25,4
0,0193	15,4
0,0064	8,4
0,0021	3,7
0,0007	0,7
0	0,0

Модели in vivo.

При необходимости можно осуществить доклиническое моделирование ингибирующего действия 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или его фармацевтически приемлемой соли в отношении CD73, например, в соответствии со способами, описанными в данной области техники, например в публикации Rongvaux A. et al., Annual Rev. Immunology, 2013, 31:635-74, и в литературных источниках, цитированных в указанном документе; Sanmamed M.F. et al., Annals of Oncology, 2016, 27:1190-1198, и в литературных источниках, цитированных в указанном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма соединения формулы



которая характеризуется по меньшей мере одним из

(а) пиком на рентгеновской дифрактограмме при угле дифракции 2-тета $4,3^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при 6,4, 9,6, 11,0 и $11,6^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и

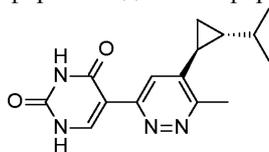
(б) спектром твердофазного ^{13}C ЯМР, который содержит пики, отнесенные относительно резонанса адамантана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при 17,2, 28,7, 122,0, 126,1, 143,6 и 155,5 м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).

2. Композиция-предшественник фармацевтической композиции, содержащая кристаллическую форму по п.1.

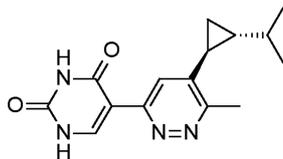
3. Композиция-предшественник фармацевтической композиции по п.2, отличающаяся тем, что композиция представляет собой гранулированную композицию.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму по п.1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

5. Кристаллическая форма по п.1, которая по меньшей мере на 95% свободна от примесей.
6. Полугидратная кристаллическая форма соединения формулы



7. Полугидратная кристаллическая форма по п.6, которая характеризуется по меньшей мере одним из
(а) пиком на рентгеновской дифрактограмме при угле дифракции 2-тета $5,0^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при $16,4$, $17,8$ и $26,6^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и
(б) спектром твердофазного ^{13}C ЯМР, который содержит пики, отнесенные относительно резонанса алмазана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $23,5$, $34,6$, $110,2$, $124,1$, $126,8$ и $166,2$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).
8. Композиция-предшественник фармацевтической композиции, содержащая полугидратную кристаллическую форму по п.6 или 7.
9. Композиция-предшественник фармацевтической композиции по п.8, отличающаяся тем, что композиция представляет собой гранулированную композицию.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая полугидратную кристаллическую форму по п.6 или 7 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.
11. Полугидратная кристаллическая форма по п.6 или 7, отличающаяся тем, что кристаллическая форма по меньшей мере на 95% свободна от примесей.
12. Композиция-предшественник фармацевтической композиции, содержащая 500 г безводной кристаллической формы соединения формулы



13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что безводная кристаллическая форма характеризуется по меньшей мере одним из
(а) пиком на рентгеновской дифрактограмме при угле дифракции 2-тета $4,7^\circ$ в сочетании с одним или более пиками при $11,7$, $15,8$, $16,0$, $26,8$ и $27,2^\circ$; с допуском на углы дифракции $0,2^\circ$; и
(б) спектром твердофазного ^{13}C ЯМР, который содержит пики, отнесенные относительно резонанса алмазана в сильном поле ($\delta=29,5$ м.д.) при $25,4$, $28,9$, $43,1$, $109,3$, $124,4$, $128,2$ и $160,7$ м.д. ($\pm 0,2$ м.д. соответственно).
14. Композиция по п.12 или 13, отличающаяся тем, что композиция представляет собой гранулированную композицию.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по п.12 или 13 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

