



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128841** (13) **C2**  
(51) МПК (2024.01)

**C07D 471/04** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/75** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 9/12** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 25/04** (2006.01)  
**A61P 25/22** (2006.01)  
**A61P 25/24** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61P 35/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>a 2021 01986</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>18.09.2019</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>07.11.2024</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>62/732,728, 62/780,553</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>18.09.2018, 17.12.2018</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>11.08.2021, Бюл.№ 32</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>06.11.2024, Бюл.№ 45</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2019/051680, 18.09.2019</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Ледебур Марк В. (US), Деніелс Меттью Х. (US), Юй Маолінь (US), Гарманж Жан-Крістоф П. (US)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>ГОЛДФІНЧ БАЙО, ІНК., 124 Washington Street, Suite 101 Foxboro, MA 02035, United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>STRAPPAGHETTI ET AL. Adenosine receptors; synthesis, structure-activity relationships and biological activity of new 6-amino purine derivatives// European Journal of Medicinal Chemistry, June 1998, Vol. 33, pp. 501-508</b> <b>MILLER ET AL. Identification of ML204, a Novel Potent Antagonist That Selectively Modulates Native TRPC4/C5 Ion Channels// Journal of Biological Chemistry, 27.07.2011, vol. 286, pp. 33436-33446</b> <b>US 2016/0046624 A1, 18.02.2016</b> <b>US 9139573 B2, 22.09.2015</b> <b>WO 2019/055966 A2, 21.03.2019</b> <b>WO 2020/191056 A1, 24.09.2020</b> <b>WO 2020/210639 A1, 15.10.2020</b></p>
--	---

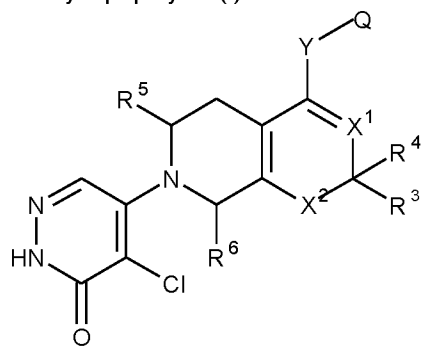
## (54) ПІРИДАЗИНОНИ ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

### (57) Реферат:

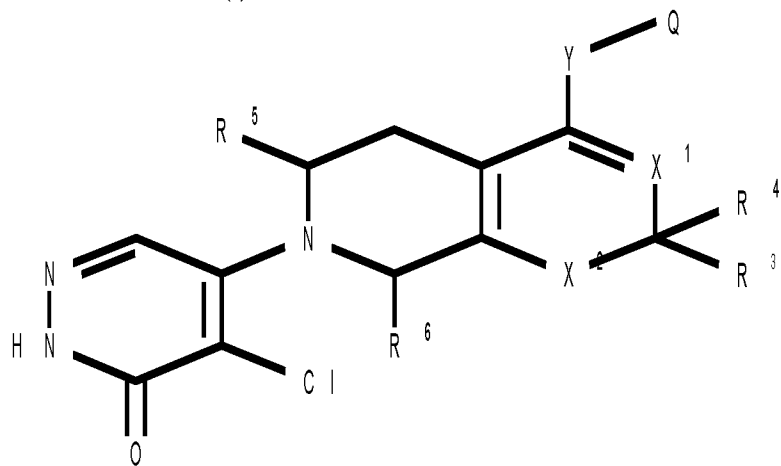
Винахід стосується сполуки формули (I) і фармацевтичної композиції на її основі. Також розкрито терапевтичні методи, наприклад, лікування захворювань нирок, із застосуванням

UA 128841 C2

сполук формули (I).



(I)



## ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНУ ЗАЯВКУ

Ця заявка витребує пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 62/732728, поданою 18 вересня 2018 р.; і за попередньою заявкою на патент США № 62/780553, поданою 17 грудня 2018 р., кожна з яких повністю включена у цей документ шляхом посилання.

5 Рівень техніки

Протеїнурія являє собою стан, при якому надмірна кількість білка в крові просочується в сечу. Протеїнурія може прогресувати від втрати 30 мг білка з сечею за 24-годинний період (так звана мікроальбумінурія) до > 300 мг/день (так звана макроальбумінурія) до досягнення рівнів 3,5 грамів білка або більше за 24 годинний період, або в 25 разів більше кількості в нормі. Протеїнурія виникає при порушенні роботи клубочків нирок, в результаті чого в організмі накопичується рідина (набряк). Було показано, що тривалий витік білка призводить до ниркової недостатності. Захворювання нефротичного синдрому (NS - англ.: Nephrotic Syndrome) становить близько 12 % поширених випадків термінальної ниркової недостатності при щорічних витратах в Сполучених Штатах більше 3 мільярдів доларів. Близько 5 з кожних 100 000 дітей щорічно діагностується з NS, і 15 з кожних 100 000 дітей сьогодні живуть з ним. У пацієнтів, які позитивно реагують на лікування, частота рецидивів надзвичайно висока. Дев'яносто % дітей з нефротичним синдромом проявляють відповідь на лікування, однак, за оцінками, у 75 % виникне рецидив. Існує потреба в більш ефективних способах лікування або зниження ризику розвитку захворювання нирок, наприклад протеїнурії.

20 Білки TRP-каналів ссавців утворюють шість трансмембранних катіонопроникних каналів, які можуть бути згруповані в шість підсімейств на основі гомології амінокислотної послідовності (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP і TRPML). Недавні дослідження TRP-каналів показують, що вони беруть участь у багатьох фундаментальних кліт інших функціях і, як вважають, відіграють важливу роль в патофізіології багатьох захворювань. Багато TRP експресуються в нирках в різних частинах нефрона, і зростаючі дані свідчать про те, що ці канали беруть участь в спадкових, а також набутих захворюваннях нирок. TRPC6, TRPM6 і TRPP2 беруть участь в спадковому фокально-сегментарному гломерулосклерозі (FSGS-focal segmental glomerulosclerosis), гіпомagneмії з вторинною гіпокальціємією (HSH-hypomagnesemia with secondary hypocalcemia) і полікістозній хворобі нирок (PKD-polycystic kidney disease) відповідно.

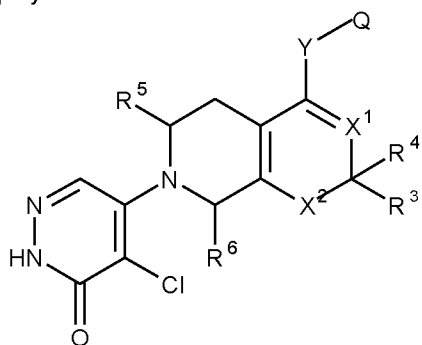
30 Повідомлялося також, що TRPC5 вносить вклад у механізми, що лежать в основі регуляції вроджених реакцій страху. (J Neurosci. 2014 Mar 5; 34(10): 3653–3667).

Отже, існує потреба в додаткових інгібіторах TRPC5 або TRPC4 або обох.

## СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

35 Винахід ґрунтується, щонайменше частково, на відкритті того, що активність транзитного потенційного катіонного каналу рецептора, підсімейства C, члена 5 (TRPC5), усуває активні стресові волокна і зменшує утворення осередкової адгезії, забезпечуючи рухливий, мігруючий фенотип подоцитів.

40 Одним з аспектів винаходу є сполуки, які являють собою антагоністи TRPC5 або TRPC4 або обох. У деяких варіантах реалізації сполука винаходу являє собою сполуку структурної формули I:



або її фармацевтично прийнятну сіль.

де:

«---» являє собою одинарний або подвійний зв'язок.

45 X<sup>1</sup> являє собою CH або N;

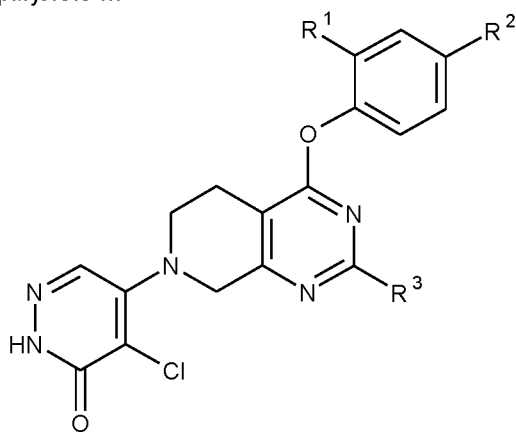
коли «---» являє собою подвійною зв'язок, X<sup>2</sup> являє собою CH або N;

коли «---» являє собою одинарний зв'язок, X<sup>2</sup> являє собою N(CH<sub>3</sub>), коли X<sup>1</sup> являє собою CH, X<sup>2</sup> являє собою N або N(CH<sub>3</sub>);

50 Y являє собою -O-, -N(CH<sub>3</sub>-), -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)-, циклопропан-1,1-диїл, або -CH(CH<sub>3</sub>-); Q являє собою 2-трифторметил-4-фторфеніл, 2-дифторметил-4-фторфеніл, 2-трифторметилфеніл, 2-

метил-4-фторфеніл, 2-хлор-4-фторфеніл, 2-хлорфеніл, 1-(бензил)-4-метилпіперидин-3-іл, 4-трифторметилпіридин-3-іл, 2-трифторметил-6-фторфеніл, 2-трифторметил-3-ціанофеніл, 2-етил-3-фторфеніл, 2-хлор-3-ціанофеніл, 2-трифторметил-5-фторфеніл або 2-дифторметилфеніл; R<sup>3</sup> являє собою водень, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)-CH<sub>2</sub>OH, -NH<sub>2</sub>, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, або -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH; і коли «---» являє собою подвійний зв'язок, R<sup>4</sup> відсутній; і коли «---» являє собою одинарний зв'язок, R<sup>3</sup> і R<sup>4</sup> взяті разом з утворенням =O; і кожен з R<sup>5</sup> і R<sup>6</sup> являє собою незалежно водень або -CH<sub>3</sub>, за умови, що якщо X<sup>1</sup> являє собою N, X<sup>2</sup> являє собою N, Y являє собою -O- або -N(CH<sub>3</sub>)-, і Q являє собою 2-трифторметилфеніл, то щонайменше один з R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, і R<sup>6</sup> не являє собою водень.

У деяких варіантах реалізації сполука за цим винаходом представлена структурною формулою II:



(II)

або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

R<sup>1</sup> являє собою хлор, -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, або -CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> являє собою водень або фтор; і R<sup>3</sup> являє собою водень, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, або CH(OH)-CH<sub>2</sub>OH.

В одному аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить сполуку винаходу і фармацевтично прийнятний носій.

В одному аспекті винахід стосується способів лікування або зниження ризику розвитку захворювання або стану, вибраного з захворювання нирок, легеневої артеріальної гіпертензії, тривожного стану, депресії, раку, діабетичної ретинопатії або болю, що включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки або композиції. У деяких варіантах реалізації захворювання являє собою захворювання нирок, тривожний стан, депресію, рак або діабетичну ретинопатію. У деяких варіантах реалізації захворювання або стан являє собою захворювання нирок, вибране з осередкового сегментарного гломерулосклерозу (FSGS), діабетичної нефропатії, синдрому Альпорта, гіпертонічної хвороби нирок, нефротичного синдрому, стероїдно-резистентного нефротичного синдрому, хвороби мінімальних змін, мембранозної нефропатії, ідіопатичної мембранозної нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту (MPGN-membranoproliferative glomerulonephritis), MPGN, опосередкованого імунним комплексом, MPGN, опосередкованого комплементом, вовчакового нефриту, постінфекційного гломерулонефриту, захворювання тонкої базальної мембрани, мезангіального проліферативного гломерулонефриту, амілоїдозу (первинного), c1q-нефропатії, швидко прогресуючого GN, захворювання anti-GBM, гломерулонефриту С3, гіпертонічного нефросклерозу або нефропатії IgA. У деяких варіантах реалізації захворювання нирок являє собою протеїнуричне захворювання нирок. У деяких варіантах реалізації захворювання нирок являє собою мікроальбумінурію або макроальбумінуричне захворювання нирок. У деяких варіантах реалізації захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою легеневу артеріальну гіпертензію. У деяких варіантах реалізації захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою біль, вибраний з невропатичного болю і вісцерального болю.

У деяких варіантах реалізації захворювання або стан являє собою рак, вибраний з хіміорезистентної карциноми молочної залози, адриаміцинорезистентного раку молочної залози, хіміорезистентного колоректального раку, медуллобластоми і ангиогенезу пухлини.

У деяких варіантах реалізації захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою пов'язаний з трансплантатом FSGS, пов'язаний з трансплантатом нефротичний синдром, пов'язаний з трансплантатом протеїнурию, холестатичне захворювання печінки, полікістоз нирок, аутосомно-домінантну полікістозну хворобу нирок (ADPKD), ожиріння, інсулінорезистентність,

діабет II типу, предіабет, метаболічний синдром, неалкогольну жирову хворобу печінки (NAFLD) або неалкогольний стеатогепатит (NASH).

Способи ефективні для безлічі суб'єктів, включаючи ссавців, наприклад людей і інших тварин, як-от лабораторні тварини, наприклад, миші, пацюки, кролики або мавпи, або домашніх і сільськогосподарських тварин, наприклад кішок, собак, кіз, овець, свиней, корів або коней.

Винахід передбачає кілька переваг. Описані в цьому документі профілактичні та терапевтичні способи ефективні при лікуванні захворювань нирок, наприклад протейнурії, і мають мінімальні побічні ефекти, якщо такі є. Крім того, описані в цьому документі способи ефективні для ідентифікації сполук, які лікують або знижують ризик розвитку захворювання нирок, тривожного стану, депресії або раку.

Якщо не вказано інше, всі вживані в цьому документі технічні та наукові терміни мають те саме значення, яке зазвичай мається на увазі середнім фахівцем в області техніки, до якої належить цей винахід. Хоча способи і матеріали, подібні або еквівалентні описаним в цьому документі, можна використовувати на практиці або під час тестування цього винаходу, придатні способи і матеріали описані нижче. Усі публікації, заявки на патенти та інші посилання, що згадані в цьому документі, повністю включені в цей документ шляхом посилання. У разі конфлікту цей опис, включаючи визначення, є превалюючим. Крім того, матеріали, способи і приклади є ілюстративними і не мають обмежувального характеру.

Інші ознаки, об'єкти і переваги цього винаходу будуть очевидними з опису та з формули винаходу.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фігурі 1 показана екскреція альбуміну у пацюків з пошкодженням PAN, які отримували сполуку 100 або мізорибін.

На Фігурі 2 показані дані по співвідношенню білка і креатиніну в сечі у трансгенних пацюків AT1R, які отримували сполуку 100, в порівнянні з несучим середовищем, з інфузією AngII.

На Фігурі 3 показані дані по співвідношенню білка і креатиніну в сечі, представлені на Фігурі 2, виражені у відсотках від вихідного рівня.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Визначення

Термін "ацил" є прийнятим в цій області техніки і стосується групи, представленої загальною формулою гідрокарбілC(O)-, переважно, алкілC(O)-.

Термін "ациламіно" є прийнятим в цій області техніки і стосується аміногрупи, заміщеної ацильною групою, і може бути представлений, наприклад, формулою гідрокарбілC(O)NH-.

Термін "ацилокси" є прийнятим в цій області техніки і стосується групи, представленої загальною формулою гідрокарбілC(O)O-, переважно алкілC(O)O-.

Термін "алкокси" стосується алкільної групи, переважно, нижчої алкільної групи, що має приєднаний до неї атом кисню. Характерні алкокси групи включають метокси, етокси, пропокси, трет-бутокси тощо.

Термін "алкоксиалкіл" стосується алкільної групи, заміщеної алкокси групою, і може бути представлений загальною формулою алкіл-O-алкіл.

Термін "алкеніл", як використовується в цьому документі, стосується аліфатичної групи, що містить щонайменше один подвійний зв'язок, і призначений для включення як "незаміщених алкенілів", так і "заміщених алкенілів", останні з яких стосуються алкенільних фрагментів, які мають замісники, що замінюють водень на одному або більше атомах вуглецю алкенільної групи. Такі замісники можуть бути на одному або більше атомах вуглецю, які включені чи не включені в один або більше подвійних зв'язків. Більше того, такі замісники включають всі ті, які передбачені для алкільних груп, як обговорюється нижче, за винятком випадків, коли не дозволяє стабільність. Наприклад, передбачається заміщення алкенільної групи однією або більше алкільними, карбоциклільними, арильними, гетероциклільними або гетероарильними групами.

"Алкільна" група або "алкан" являє собою лінійний або розгалужений неароматичний вуглеводень, який є повністю насиченим. Зазвичай алкільна група з лінійним або розгалуженим ланцюгом має від 1 до 20 атомів вуглецю, переважно, від 1 до 10, якщо не вказано інше. Приклади груп з лінійною і розгалуженою алкільною групою включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, гексил, пентил і октил. Алкільна група з лінійним або розгалуженим ланцюгом C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> також згадується як група "нижчий алкіл".

Більше того, термін "алкіл" (або "нижчий алкіл"), як використовується по всьому опису, в прикладах і формулі винаходу, призначений для включення як "незаміщених алкілів", так і "заміщених алкілів", останні з яких відносяться до алкільних фрагментів, які мають замісники, що замінюють водень на одному або більше атомах вуглецю вуглеводневого скелета. Такі

замісники, якщо не вказано інше, можуть включати, наприклад, галоген (наприклад, фтор), гідроксил, карбоніл (як-от карбоксил, алкоксикарбоніл, форміл або ацил), тіокарбоніл (як-от тіоестер, тіоацетат або тіоформіат), алкокси, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфінат, аміно, амідно, амідин, імін, ціано, нітро, азидо, сульфгідрил, алкілтіо, сульфат, сульфонат, сульфоаміоїл, сульфоамідно, сульфоніл, гетероцикліл, аралкіл або ароматичний або гетероароматичний фрагмент. У переважних варіантах здійснення замісники на заміщених алкілах вибрані з C<sub>1-6</sub> алкіла, C<sub>3-6</sub> циклоалкіла, галогену, карбонілу, ціано або гідроксилу. У більш переважних варіантах здійснення замісники на заміщених алкілах вибрані з фтору, карбонілу, ціано або гідроксилу. Фахівцям в цій області техніки буде зрозуміло, що фрагменти, заміщені у вуглеводневому ланцюзі, самі можуть бути заміщеними, якщо це необхідно. Наприклад, замісники заміщеного алкіла можуть включати заміщені і незаміщені форми аміно, азидо, іміно, амідно, фосфорильних (включаючи фосфонат і фосфінат), сульфонільних (включаючи сульфат, сульфоамідно, сульфоаміоїл і сульфонат) і силільних груп, а також етери, алкілтіо, карбоніли (включаючи кетони, альдегіди, карбоксилати і естери), -CF<sub>3</sub>, -CN тощо. Приклади заміщених алкілів описані нижче. Циклоалкіли можуть бути додатково заміщені алкілами, алкенілами, алкокси, алкілтіо, аміноалкілами, карбоніл-заміщеними алкілами, CF<sub>3</sub>, -CN тощо.

Якщо не вказано інше, "алкілен" сам по собі або як частина іншого замісника відноситься до насиченої двовалентної групи з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що має вказане число атомів вуглецю і отримана в результаті видалення двох атомів водню з відповідного алкана. Приклади лінійних і розгалужених алкіленових груп включають -CH<sub>2</sub>- (метилен), -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (етилен), -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (пропілен), -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (пентилен), -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, і -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

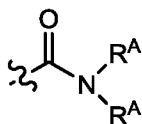
Термін "C<sub>x-y</sub>", коли використовується в поєднанні з хімічним фрагментом, як-от ацил, ацилокси, алкіл, алкеніл, алкініл або алкокси, призначений для включення груп, які містять від x до y атомів вуглецю в ланцюзі. Наприклад, термін "C<sub>x-y</sub> алкіл" відноситься до заміщених або незаміщених насичених вуглеводневих груп, включаючи алкіл з лінійним ланцюгом і алкільні групи з розгалуженим ланцюгом, які містять від x до y атомів вуглецю в ланцюзі, включаючи галогеналкільні групи. Переважні галогеналкільні групи включають в себе трифторметил, дифторметил, 2,2,2-трифторетил і пентафторетил. C<sub>0</sub> алкіл являє собою водень, де група розташована в кінцевому положенні зв'язку, якщо вона внутрішня. Терміни "C<sub>2-y</sub> алкеніл" і "C<sub>2-y</sub> алкініл" відносяться до заміщених або незаміщених ненасичених аліфатичних груп, аналогічних за довжиною і можливими замінами описаним вище алкілам, але що містять щонайменше один подвійний або потрійний зв'язок, відповідно.

Термін "алкіламіно", як використовується в цьому документі, відноситься до аміно групи, заміщеної щонайменше однією алкільною групою.

Термін "алкілтіо", як використовується в цьому документі, відноситься до тіольної групи, заміщеної алкільною групою, і може бути представлений загальною формулою алкілS-.

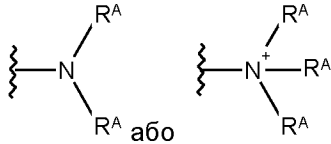
Термін "алкініл", як використовується в цьому документі, відноситься до аліфатичної групи, що містить щонайменше один потрійний зв'язок, і призначений для включення як "незаміщених алкінілів", так і "заміщених алкінілів", останні з яких відносяться до алкінільних фрагментів, які мають замісники, що заміняють водень на одному або більше атомах вуглецю алкінільної групи. Такі замісники можуть бути на одному або більше атомах вуглецю, які включені чи не включені в один або більше потрійних зв'язків. Більш того, такі замісники включають в себе всі ті, які передбачені для алкільних груп, як обговорювалося вище, за винятком випадків, коли не дозволяє стабільність. Наприклад, передбачається заміщення алкінільної групи однією або більше алкільними, карбоциклільними, арильними, гетероциклільними або гетероарильними групами.

Термін "амід", як використовується в цьому документі, стосується групи,



де кожен R<sup>A</sup> незалежно являє собою водень або гідрокарбильну групу, або два R<sup>A</sup>, взяті разом з атомом N, до якого вони приєднані, складають гетероцикл, який має від 4 до 8 атомів в кільцевій структурі.

Терміни "амін" і "аміно" є відомими в області техніки і відносяться як до незаміщених, так і заміщених амінів і їх солей, наприклад, до групи, яка може бути представлена



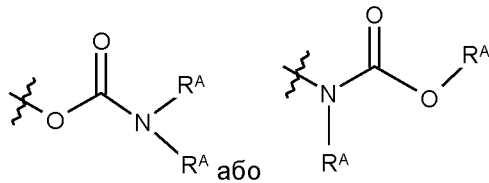
де кожен  $R^A$  незалежно являє собою водень або гідрокарбильну групу, або два  $R^A$ , взяті разом з атомом N, до якого вони приєднані, складають гетероцикл, який має від 4 до 8 атомів в кільцевій структурі.

5 Термін "аміноалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної аміно групою.

Термін "аралкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної арильною групою.

10 Термін "арил", як використовується в цьому документі, включає заміщені або незаміщені ароматичні групи з одним кільцем, в яких кожен атом кільця являє собою вуглець. Переважно кільце являє собою 6 або 10-членне кільце, більш переважно 6-членне кільце. Термін "арил" також включає поліциклічні кільцеві системи, що мають два або більше циклічних кільця, в яких два або більше атомів вуглецю є спільними для двох сусідніх кілець, де щонайменше одне з кілець є ароматичним, наприклад, інші циклічні кільця можуть бути циклоалкільними, циклоалкенільними, циклоалкінільними, арильними, гетероарильними і/або гетероциклільними.

15 Арильні групи включають бензен, нафталін, фенантрен, фенол, анілін тощо.  
Термін "карбамат" є прийнятим в цій області техніки і відноситься до групи



20 де кожен  $R^A$  незалежно являє собою водень або гідрокарбильну групу, як-от алкільна група, або обидва  $R^A$ , взяті разом з проміжним атомом (ами), складають гетероцикл, який має від 4 до 8 атомів в кільцевій структурі.

Терміни "карбоцикл" і "карбоциклічне", як використовується в цьому документі, відносяться до насиченого або ненасиченого кільця, в якому кожен атом кільця являє собою вуглець. Термін карбоцикл включає як ароматичні карбоцикли, так і неароматичні карбоцикли. Неароматичні карбоцикли включають як циклоалканові кільця, в яких всі атоми вуглецю є насиченими, так і циклоалкенові кільця, які містять щонайменше один подвійний зв'язок. "Карбоцикл" включає 5-7-членні моноциклічні і 8-12-членні біциклічні кільця. Кожне кільце біциклічного карбоцикла може бути вибрано з насичених, ненасичених та ароматичних кілець. Карбоцикл включає біциклічні молекули, в яких один, два або три або більше атомів є спільними для двох кілець. Термін "конденсований карбоцикл" відноситься до біциклічного карбоцикла, в якому кожне з кілець розділяє два сусідніх атома з іншим кільцем. Кожне кільце конденсованого карбоцикла може бути вибрано з насичених, ненасичених та ароматичних кілець. У прикладі варіанту реалізації ароматичне кільце, наприклад, феніл, може бути конденсоване з насиченим або ненасиченим кільцем, наприклад, циклогексаном, циклопентаном або циклогексеном. Будь-яка комбінація насичених, ненасичених та ароматичних біциклічних кілець, наскільки дозволяє валентність, включена в визначення карбоциклічний. Приклади "карбоциклів" включають циклопентан, циклогексан, біцикло[2.2.1]гептан, 1,5-циклооктадієн, 1,2,3,4-тетрагідронафталін, біцикло[4.2.0]окт-3-ен, нафталін і адамантан. Приклади конденсованих карбоциклів включають декалін, нафталін, 1,2,3,4-тетрагідронафталін, біцикло[4.2.0]октан, 4,5,6,7-тетрагідро-1H-інден і біцикло[4.1.0]гепт-3-ен. "Карбоцикли" можуть бути заміщені по будь-якому одному або більше положенням, здатним нести атом водню.

"Циклоалкільна" група являє собою циклічний вуглеводень, який є повністю насиченим. "Циклоалкіл" включає моноциклічні і біциклічні кільця. Зазвичай моноциклічна циклоалкільна група містить від 3 до близько 10 атомів вуглецю, більш зазвичай, від 3 до 8 атомів вуглецю, якщо не вказано інше. Друге кільце біциклічного циклоалкіла може бути вибрано з насичених, ненасичених та ароматичних кілець. Циклоалкіл включає біциклічні молекули, в яких один, два або три або більше атомів є спільними для двох кілець. Термін "конденсований циклоалкіл" відноситься до біциклічного циклоалкіла, в якому кожне з кілець має два спільних сусідніх атомів з іншим кільцем. Друге кільце конденсованого біциклічного циклоалкіла може бути вибрано з насичених, ненасичених та ароматичних кілець. "Циклоалкенільна" група є циклічним вуглеводнем, що містить один або більше подвійних зв'язків.

Термін "карбоцикліалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної карбоциклічною групою.

Термін "карбонат" є прийнятим в цій області техніки і відноситься до групи  $-\text{OCO}_2\text{-R}^A$ , де  $\text{R}^A$  являє собою гідрокарбильну групу.

5 Термін "карбоксі", як використовується в цьому документі, стосується групи, представленої формулою  $-\text{CO}_2\text{H}$ .

Термін "естер", як використовується в цьому документі, стосується групи  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^A$ , де  $\text{R}^A$  являє собою гідрокарбильну групу.

10 Термін "етер", як використовується в цьому документі, стосується гідрокарбильної групи, з'єднаної через атом кисню з іншою гідрокарбильною групою. Відповідно, етерний замісник гідрокарбильної групи може являти собою гідрокарбіл-О-. Етери можуть бути як симетричними, так і несиметричними. Приклади етерів включають, але не обмежуються ними, гетероцикл-О-гетероцикл і арил-О-гетероцикл. Етери включають "алкоксиалкільні" групи, які можуть бути представлені загальною формулою алкіл-О-алкіл.

15 Терміни "гало" і "галоген", як використовуються в цьому документі, означають галоген і включають хлор, фтор, бром і йод.

Терміни "гетаралкіл" і "гетероаралкіл", як використовується в цьому документі, стосуються алкільної групи, заміщеної гетарильною групою.

20 Термін "гетероалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до насиченого або ненасиченого ланцюга атомів вуглецю і щонайменше одного гетероатому, причому ніякі два гетероатоми не є суміжними

Терміни "гетероарил" і "гетарил" включають заміщені або незаміщені ароматичні однокільцеві структури, переважно, 5-7-членні кільця, більш переважно, 5-6-членні кільця, де кільцеві структури включають щонайменше один гетероатом, переважно, від одного до чотирьох гетероатомів, більш переважно, один або два гетероатоми. Терміни "гетероарил" і "гетарил" включають також поліциклічні кільцеві системи, що містять два або більше циклічних кілець, в яких два або більше атомів вуглецю є спільними для двох сусідніх кілець, де щонайменше одне з кілець є гетероароматичним, наприклад, інші циклічні кільця можуть являти собою циклоалкіли, циклоалкеніли, циклоалкініли, арили, гетероарили і/або гетероцикліли. Гетероарильні групи включають, наприклад, пірол, фуран, тіофен, імідазол, оксазол, тіазол, піразол, піридин, піразин, піридазин і піримідин тощо.

30 Термін "гетероатом", як використовується в цьому документі, означає атом будь-якого елемента, відмінного від вуглецю або водню. Переважними гетероатомами є азот, кисень і сірка.

35 Терміни "гетероцикліл", "гетероцикл" і "гетероциклічний" відносяться до заміщених або незаміщених неароматичних кільцевих структур, переважно, 3-10-членних кілець, більш переважно, 3-7-членних кілець, де кільцеві структури включають щонайменше один гетероатом, переважно, від одного до чотирьох гетероатомів, більш переважно, один або два гетероатоми. Терміни "гетероцикліл" і "гетероциклічний" включають також поліциклічні кільцеві системи, що містять два або більше циклічних кілець, в яких два або більше атомів вуглецю є спільними для двох сусідніх кілець, де щонайменше одне з кілець є гетероциклічним, наприклад, інші циклічні кільця можуть являти собою циклоалкіли, циклоалкеніли, циклоалкініли, арили, гетероарили і/або гетероцикліли. Гетероциклільні групи включають в себе, наприклад, піперидин, піперазин, піролідин, тетрагідропіран, тетрагідрофуран, морфолін, лактони, лактами тощо.

45 Термін "гетероцикліалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної гетероциклічною групою.

Термін "гідрокарбіл", як використовується в цьому документі, стосується групи, яка пов'язана через атом вуглецю, у якого немає замісника  $=\text{O}$  або  $=\text{S}$ , і зазвичай містить щонайменше один вуглець-водневий зв'язок і, переважно, вуглецевий скелет, але, необов'язково, може включати гетероатоми. Таким чином, групи, подібні метилу, етоксіетилу, 2-піридилу і трифторметилу, розглядаються як гідрокарбіл для цілей цієї заявки, але не такі замісники, як ацетил (який має  $=\text{O}$  замісник на зв'язуючому атомі вуглецю) і етокси (який приєднаний через атом кисню, а не атом вуглецю). Гідрокарбільні групи включають, але цим не обмежуються, арил, гетероарил, карбоцикл, гетероцикліл, алкіл, алкеніл, алкініл і їх комбінації.

55 Термін "гідроксиалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної гідрокси групою.

Термін "нижчий", коли використовується в поєднанні з хімічним фрагментом, як-от ацил, ацилокси, алкіл, алкеніл, алкініл або алкокси, призначений для включення груп, де в заміснику є десять або менше неводневих атомів, переважно, шість або менше. "Нижчий алкіл", наприклад, 60 відноситься до алкільної групи, яка містить десять або менше атомів вуглецю, переважно, шість

або менше. У деяких варіантах реалізації ацил, ацилокси, алкіл, алкеніл, алкініл, або алкокси замісники, визначені в цьому документі, являють собою, відповідно, нижчий ацил, нижчий ацилокси, нижчий алкіл, нижчий алкеніл, нижчий алкініл або нижчий алкокси, представлені вони самі по собі або в поєднанні з іншими замісниками, як-от в описах гідроксиалкіл і аралкіл (в цьому випадку, наприклад, атоми в арильній групі не враховуються при підрахунку атомів вуглецю в алкільному заміснику).

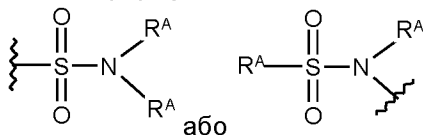
Терміни "поліцикліл", "поліцикл" і "поліциклічний" відносяться до двох або більше кілець (наприклад, циклоалкілів, циклоалкенілів, циклоалкінілів, арилів, гетероарилів і/або гетероциклілів), в яких два або більше атомів є спільними для двох сусідніх кілець, наприклад, кільця являють собою "коденсовані кільця". Кожне з кілець поліциклу може бути заміщеним або незаміщеним. У деяких варіантах реалізації кожне кільце поліциклу містить від 3 до 10 атомів в кільці, переважно, від 5 до 7.

Термін "силіл" відноситься до групи кремнію з трьома приєднаними до неї гідрокарбільними фрагментами.

Термін "заміщений" відноситься до фрагментів, які мають замісники, які заміняють водень на одному або більше атомах вуглецю основного ланцюга. Зрозуміло, що "заміщення" або "заміщений" включає в себе неявну умову, що таке заміщення відповідає допустимій валентності заміщеного атома і замісника, і що заміщення призводить до стабільної сполуки, наприклад, яка мимоволі не піддається трансформації, як-от перегрупування, циклізація, елімінування тощо. Як використовується в цьому документі, термін "заміщений" передбачає включення всіх допустимих замісників органічних сполук. У широкому аспекті допустимі замісники включають ациклічні та циклічні, розгалужені і нерозгалужені, карбоциклічні і гетероциклічні, ароматичні та неароматичні замісники органічних сполук. Допустимі замісники можуть бути одним або більше і однаковими або різними для відповідних органічних сполук. Для цілей цього винаходу гетероатоми, як-от азот, можуть мати водневі замісники та/або будь-які допустимі замісники органічних сполук, описані в цьому документі, які задовольняють валентності гетероатомів. Замісники можуть включати будь-які замісники, описані в цьому документі, наприклад, галоген, гідроксил, карбоніл (як-от карбоксил, алкоксикарбоніл, форміл або ацил), тіокарбоніл (як-от тіоетер, тіоацетат або тіоформіат), алкокси, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфінат, аміно, амідно, амідин, імін, ціано, нітро, азидо, сульфгідрил, алкілтіо, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамідно, сульфоніл, гетероцикліл, аралкіл або ароматичний або гетероароматичний фрагмент. У переважних варіантах здійснення замісники на заміщених алкілах вибрані з C<sub>1-6</sub> алкіла, C<sub>3-6</sub> циклоалкіла, галогену, карбонілу, ціано або гідроксилу. У більш переважних варіантах здійснення замісники на заміщених алкілах вибрані з фтору, карбонілу, ціано або гідроксилу. Фахівцям в цій області буде зрозуміло, що замісники самі можуть бути заміщені, якщо це необхідно. Якщо спеціально не вказано, що вони є "незаміщеними", посилення на хімічні фрагменти в цьому описі розуміються як такі, що включають заміщені варіанти. Наприклад, посилення на "арильну" групу або фрагмент неявно включає як заміщені, так і незаміщені варіанти.

Термін "сульфат" відомий в цій області техніки і відноситься до групи -OSO<sub>3</sub>H або її фармацевтично прийнятної солі.

Термін "сульфонамід" відомий в цій області техніки і відноситься до групи, представленій загальними формулами



де кожен R<sup>A</sup> незалежно являє собою водень або гідрокарбїл, як-от алкіл, або обидва R<sup>A</sup>, взяті разом з проміжним атомом (ами), складають гетероцикл, який має від 4 до 8 атомів в кільцевій структурі.

Термін "сульфоксид" є прийнятим в цій області техніки і відноситься до групи -S(O)-R<sup>A</sup>, де R<sup>A</sup> являє собою гідрокарбїл.

Термін "сульфонат" є прийнятим в цій області техніки і відноситься до групи -SO<sub>3</sub>H або її фармацевтично прийнятної солі.

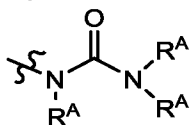
Термін "сульфон" є прийнятим в цій області техніки і відноситься до групи -S(O)<sub>2</sub>-R<sup>A</sup>, де R<sup>A</sup> являє собою гідрокарбїл.

Термін "тіоалкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до алкільної групи, заміщеної тіольною групою.

Термін "тіоестер", як використовується в цьому документі, стосується групи -C(O)SR<sup>A</sup> або -SC(O)R<sup>A</sup>, де R<sup>A</sup> являє собою гідрокарбїл.

Термін "тіоетер", як використовується в цьому документі, еквівалентний етеру, де атом кисню замінений на атом сірки.

Термін "сечовина" є прийнятим в цій області техніки і може бути представлений загальною формулою



5

де кожен  $\text{R}^A$  незалежно являє собою водень або гідрокарбіл, як-от алкіл, або будь-яку присутність  $\text{R}^A$ , взятого разом з іншим, і проміжний атом (и) складає гетероцикл, який має від 4 до 8 атомів в кільцевій структурі.

"Захисна група" відноситься до групи атомів, які в разі приєднання до реакційноздатної функціональної групи в молекулі маскують, зменшують або запобігають реакційній здатності функціональної групи. Як правило, захисна група може бути селективно видалена за бажанням в ході синтезу. Приклади захисних груп можна знайти в оглядах Greene і Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY and Harrison et al., *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vols. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Характерні азотозахисні групи включають, але не обмежуються ними, форміл, ацетил, трифторацетил, бензил, бензілоксикарбоніл ("CBZ"), трет-бутоксикарбоніл ("Boc"), триметилсиліл ("TMS"), 2-триметилсиліл-етансульфоніл ("TES"), тритильну і заміщену тритильну групи, алілоксикарбоніл, 9-флуоренілметилоксикарбоніл ("FMOC"), нітро-вератрилоксикарбоніл ("NVOC") тощо. Характерні гідроксилзахисні групи включають, але цим не обмежуються, такі, де гідроксильна група є або ацильованою (естерифікованою), або алкіловою, як-от бензиловою і тритильною етери, а також алкілові етери, тетрагідропіранілові етери, триалкілсилілові етери (наприклад, TMS або TIPS групи), гліколеві етери, як-от похідні етиленгліколю та пропіленгліколю і алілові етери.

Як використовується в цьому документі, терапевтичний агент, який "запобігає" або "знижує ризик розвитку" захворювання, розладу або патологічного стану, відноситься до сполуки, яка в статистичній вибірці призводить до зниження випадків виникнення захворювання, розладу або патологічного стану в обробленому зразку відносно необробленого контрольного зразка, або затримує виникнення, або зменшує тяжкість одного або більше симптомів розладу або патологічного стану відносно необробленого контрольного зразка.

Термін "лікування" включає профілактичне та/або терапевтичне лікування. Термін "профілактичне або терапевтичне" лікування визнаний у цій області техніки й включає введення господарю однієї або декількох композицій, що розглядаються. Якщо її вводять до клінічного прояву небажаного стану (наприклад, захворювання або іншого небажаного стану тварини-господаря), тоді лікування є профілактичним (тобто воно захищає господаря від розвитку небажаного стану); тоді як, якщо її вводять після прояву небажаного стану, лікування є терапевтичним (тобто воно призначене для зменшення, поліпшення або стабілізації існуючого небажаного стану або його побічних ефектів).

Використовуваний в цьому документі вираз "сумісне введення" або "введення сумісно" відноситься до будь-якої форми введення двох або більше різних терапевтичних сполук таким чином, що другу сполуку вводять у той час як раніше введена терапевтична сполука все ще діє в організмі (наприклад, дві сполуки є одночасно ефективними у суб'єкта, що може включати синергетичну дію двох сполук). Наприклад, різні терапевтичні сполуки можуть вводитися або в одній і тій же композиції, або в окремих композиціях, одночасно або послідовно. В окремих варіантах здійснення різні терапевтичні сполуки та кон'югати можуть вводитися протягом однієї години, 12 годин, 24 годин, 36 годин, 48 годин, 72 годин або тижня по черзі. Таким чином, індивідуум, який отримує таке лікування, може отримати користь від комбінованої дії різних терапевтичних агентів.

Термін "проліки" призначений для охоплення сполук, які у фізіологічних умовах перетворюються в терапевтично активні агенти за цим винаходом. Загальний спосіб отримання проліків полягає у включенні одного або більше обраних фрагментів, які гідролізуються в фізіологічних умовах, вивільняючи бажану молекулу. В інших варіантах реалізації проліки перетворюються під дією ферментативної активності тварини-господаря. Наприклад, естери або карбонати (наприклад, естери або карбонати спиртів або карбонових кислот) є переважними проліками за цим винаходом. У деяких варіантах здійснення деякі або всі сполуки за цим винаходом у представленому вище складі можуть бути замінені на відповідні проліки, наприклад, у яких гідроксил вихідної сполуки представлений у вигляді естеру або карбонату, або карбонова кислота, що міститься у вихідній сполуці, представлена у вигляді естеру.

Використовуваний в цьому документі термін "малі молекули" відноситься до невеликих органічних або неорганічних молекул з молекулярною масою нижче близько 3000 дальтон. Як правило, невеликі молекули, придатні для використання у винаході, мають молекулярну масу менше 3000 дальтон (Да). Малі молекули можуть мати, наприклад, від щонайменше близько 100 Да до близько 3000 Да (наприклад, від близько 100 до близько 3000 Да, від близько 100 до близько 2500 Да, від близько 100 до близько 2000 Да, від близько 100 до приблизно 1750 Да, від приблизно 100 до приблизно 1500 Да, від приблизно 100 до близько 1250 Да, від близько 100 до близько 1000 Да, від близько 100 до близько 750 Да, від близько 100 до близько 500 Да, від близько 200 до близько 1500, від близько 500 до близько 1000, від близько 300 до близько 1000 Да чи від близько 100 до близько 250 Да).

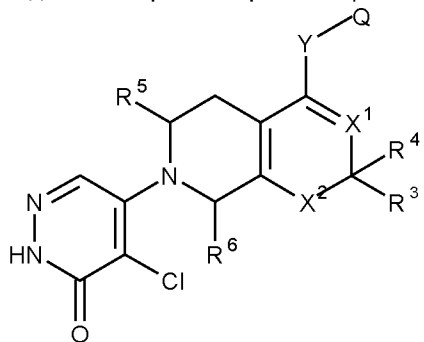
У деяких варіантах реалізації "мала молекула" відноситься до органічної, неорганічної або металоорганічної сполуки, що зазвичай має молекулярну масу менше близько 1000. У деяких варіантах реалізації мала молекула являє собою органічну сполуку розміром близько 1 нм. У деяких варіантах реалізації низькомолекулярні лікарські засоби згідно з винаходом включають олігопептиди та інші біомолекули, що мають молекулярну масу менше близько 1000.

"Ефективна кількість" — це кількість, достатня для досягнення позитивних або бажаних результатів. Наприклад, терапевтична кількість являє собою таку кількість, яка забезпечує бажаний терапевтичний ефект. Ця кількість може бути такою ж або відрізнитися від профілактично ефективної кількості, яка є кількістю, необхідною для запобігання появи захворювання або симптомів захворювання. Ефективну кількість можна вводити за одне або декілька введень, застосувань або дозувань. Терапевтично ефективна кількість композиції залежить від обраної композиції. Композиції можна вводити від одного або декількох разів на день до одного або кількох разів на тиждень; в тому числі 1 раз в два дні. Кваліфікований фахівець зрозуміє, що певні фактори можуть впливати на дозування і час, необхідні для ефективного лікування суб'єкта, включаючи, але не обмежуючись цим, тяжкість захворювання або порушення, попереднє лікування, загальний стан здоров'я і/або вік суб'єкта і інші присутні хвороби. Більше того, лікування суб'єкта терапевтично ефективною кількістю описаних в цьому документі композицій може включати одне лікування або серію курсів лікування.

Сполуки за цим винаходом

Один аспект винаходу стосується низькомолекулярних інгібіторів TRPC5.

У деяких варіантах реалізації сполука винаходу являє собою сполуку структурної формули I:



(I)

або її фармацевтично прийнятну сіль.

де:

«---» являє собою одинарний або подвійний зв'язок.

X<sup>1</sup> являє собою СН або N;

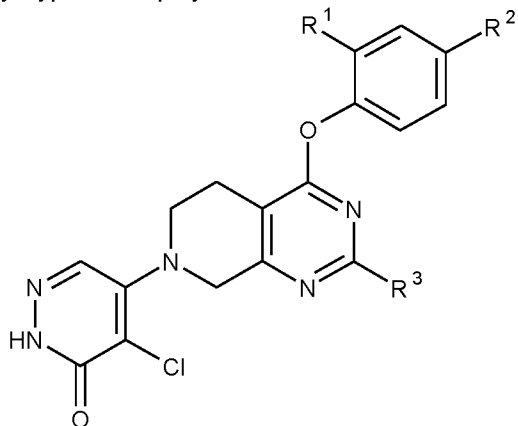
коли «---» являє собою подвійною зв'язок, X<sup>2</sup> являє собою СН або N;

коли «---» являє собою одинарний зв'язок, X<sup>2</sup> являє собою N(CH<sub>3</sub>), коли X<sup>1</sup> являє собою СН, X<sup>2</sup> являє собою N або N(CH<sub>3</sub>);

Y являє собою -O-, -N(CH<sub>3</sub>)-, -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)-, циклопропан-1,1-диіл, або -CH(CH<sub>3</sub>)-; Q являє собою 2-трифторметил-4-фторфеніл, 2-дифторметил-4-фторфеніл, 2-трифторметилфеніл, 2-метил-4-фторфеніл, 2-хлор-4-фторфеніл, 2-хлорфеніл, 1-(бензил)-4-метилпіперидин-3-іл, 4-трифторметилпіридин-3-іл, 2-трифторметил-6-фторфеніл, 2-трифторметил-3-ціанофеніл, 2-етил-3-фторфеніл, 2-хлор-3-ціанофеніл, 2-трифторметил-5-фторфеніл або 2-

дифторметилфеніл; R<sup>3</sup> являє собою водень, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)-CH<sub>2</sub>OH, -NH<sub>2</sub>, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, або -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH; і коли «---» являє собою подвійний зв'язок, R<sup>4</sup> відсутній; і коли «---» являє собою одинарний зв'язок, R<sup>3</sup> і R<sup>4</sup> взяті разом з утворенням =O; і кожен з R<sup>5</sup> і R<sup>6</sup> являє собою незалежно водень або -CH<sub>3</sub>, за умови, що якщо X<sup>1</sup> являє собою N, X<sup>2</sup> являє собою N, Y являє собою -O- або -N(CH<sub>3</sub>)-, і Q являє собою 2-трифторметилфеніл, то, щонайменше, один з R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, і R<sup>6</sup> не є воднем.

У деяких варіантах реалізації сполука за винаходом являє собою сполуку, представлену структурною Формулою II:



(II)

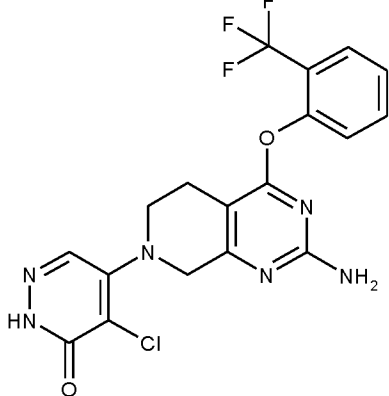
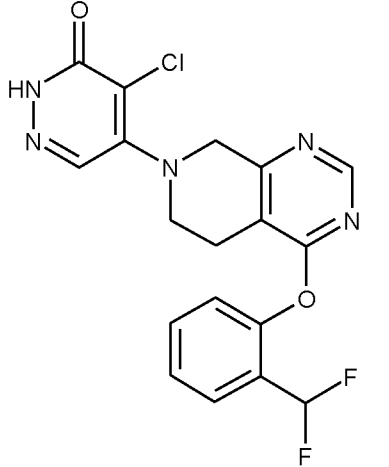
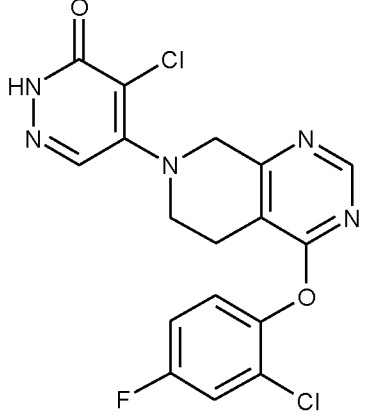
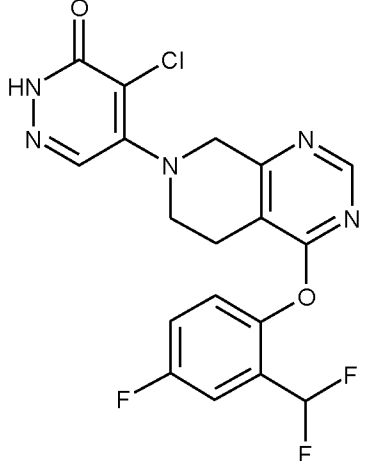
5 або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:  
 R<sup>1</sup> являє собою хлор, -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, або -CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> являє собою водень або фтор; і R<sup>3</sup> являє собою водень, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, або CH(OH)-CH<sub>2</sub>OH.

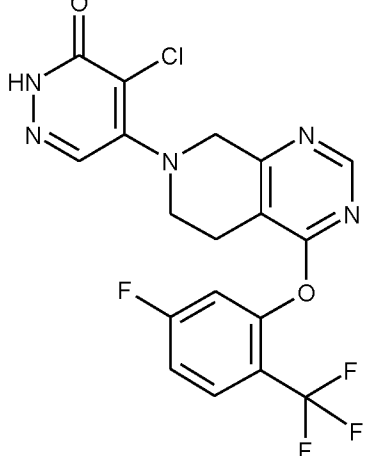
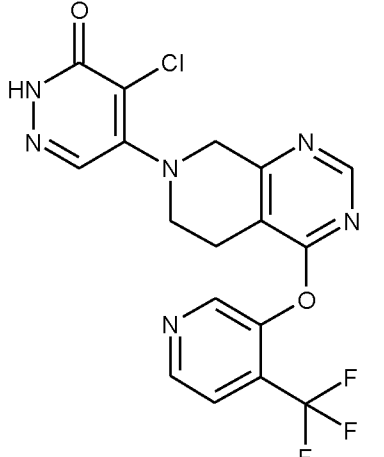
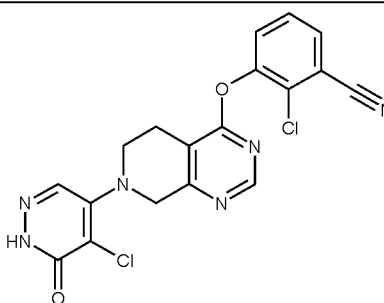
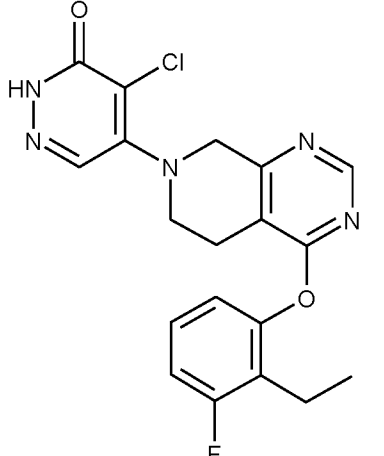
У деяких варіантах реалізації, коли R<sup>1</sup> являє собою -CHF<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> не є воднем.

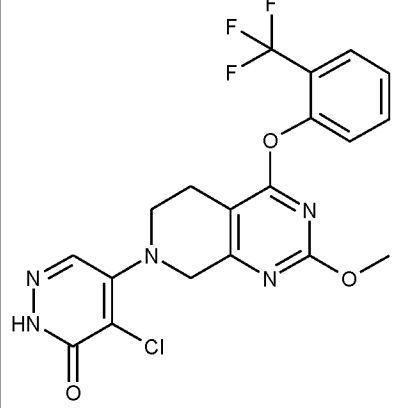
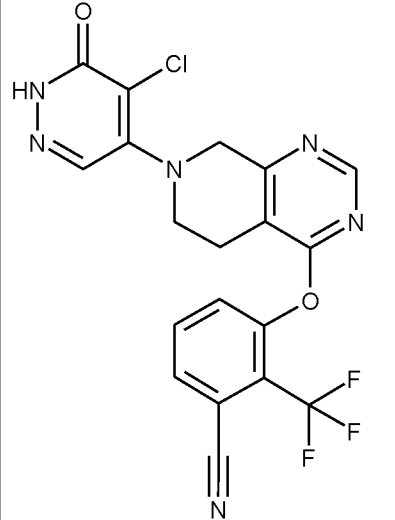
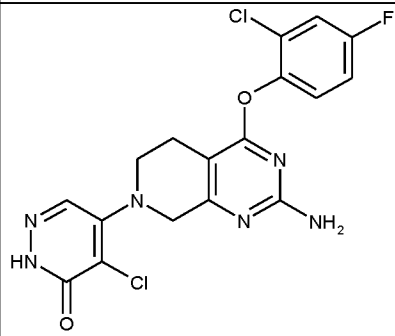
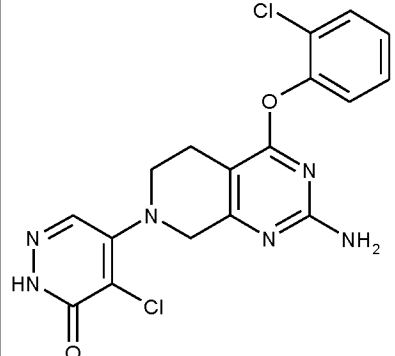
У деяких варіантах реалізації сполука за винаходом вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

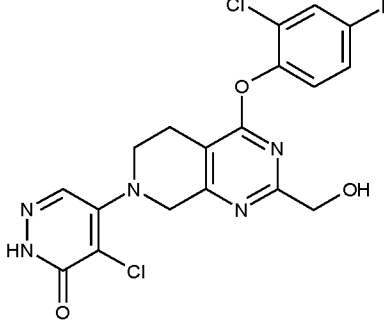
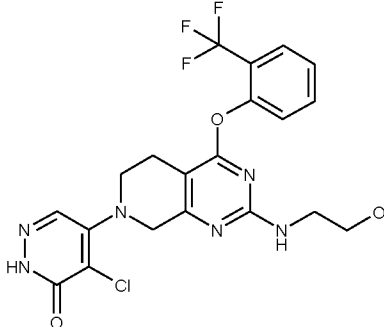
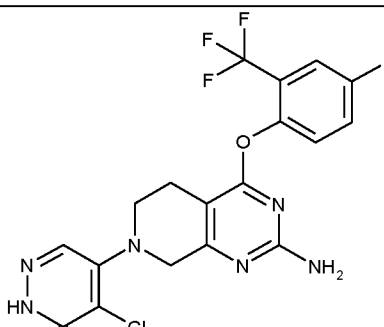
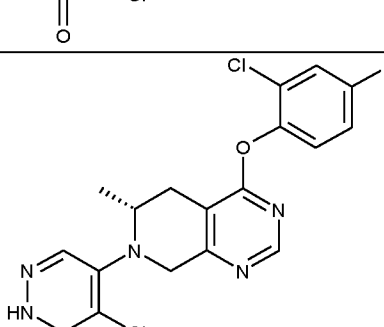
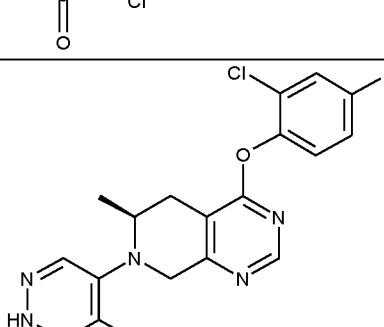
10

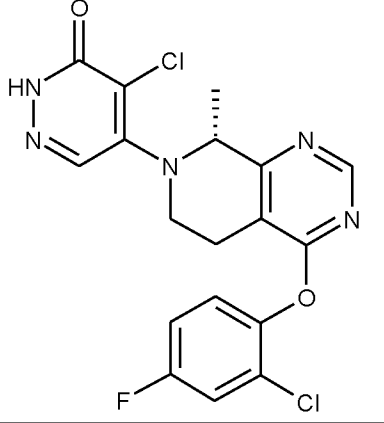
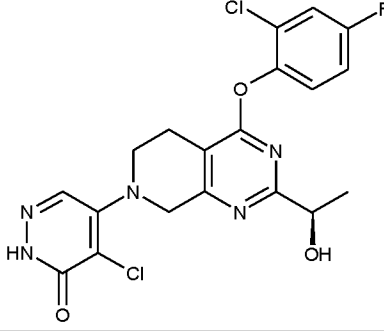
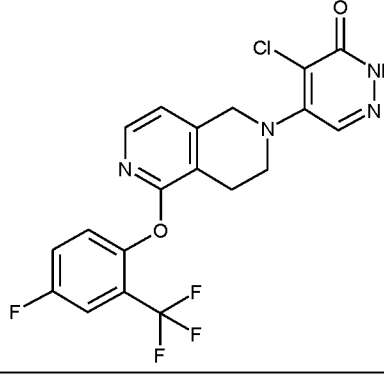
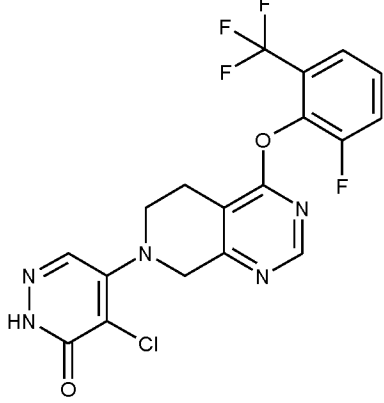
Сполука	Структура
100	
101	

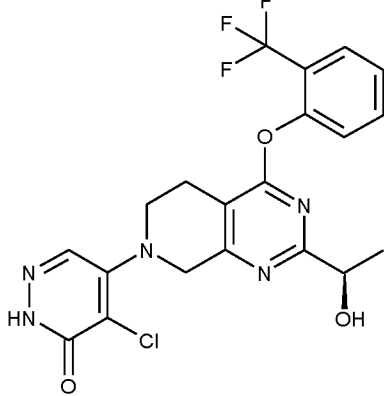
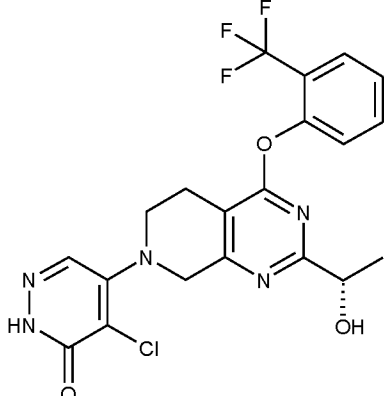
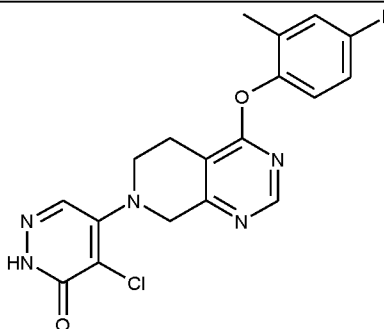
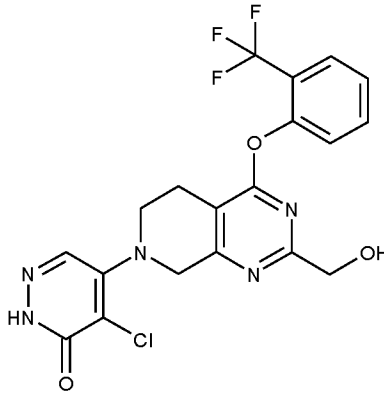
Сполука	Структура
102	 <chem>ClC1=CN=C(NC1=O)N2CCN(CC2)c3nc(N)n(c3)Oc4ccccc4C(F)(F)F</chem>
103	 <chem>ClC1=CN=C(NC1=O)N2CCN(CC2)c3nc(N)n(c3)Oc4ccccc4C(F)F</chem>
104	 <chem>ClC1=CN=C(NC1=O)N2CCN(CC2)c3nc(N)n(c3)Oc4ccc(Cl)c(F)c4</chem>
105	 <chem>ClC1=CN=C(NC1=O)N2CCN(CC2)c3nc(N)n(c3)Oc4ccc(Cl)c(C(F)F)c4</chem>

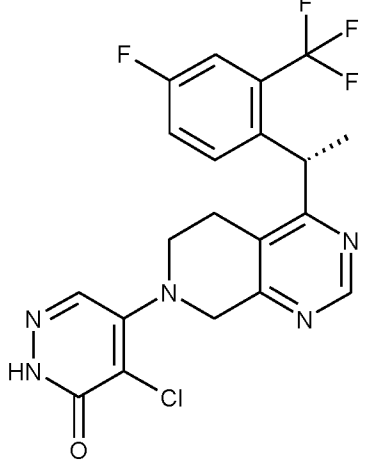
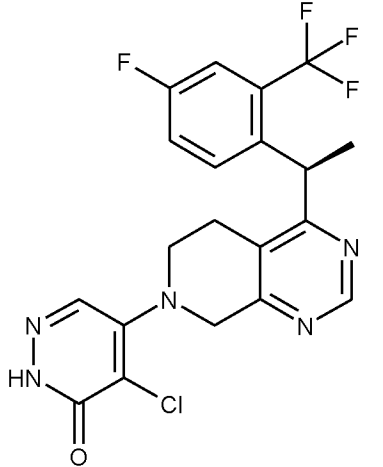
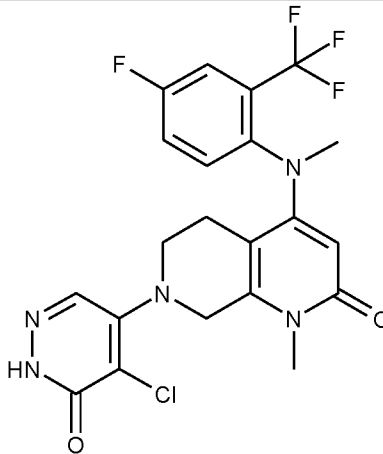
Сполука	Структура
106	 <chem>O=C1NC=CC(=N1)C2=CN=CN=C2N3CCNCC3OC4=CC=C(C(F)(F)F)C(F)=C4</chem>
107	 <chem>O=C1NC=CC(=N1)C2=CN=CN=C2N3CCNCC3OC4=CC=CC(=C4)C(F)(F)F</chem>
108	 <chem>O=C1NC=CC(=N1)C2=CN=CN=C2N3CCNCC3OC4=CC=C(C#N)C(Cl)=C4</chem>
109	 <chem>O=C1NC=CC(=N1)C2=CN=CN=C2N3CCNCC3OC4=CC=C(C(F)=C4)CC</chem>

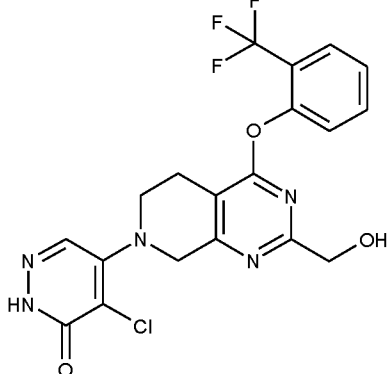
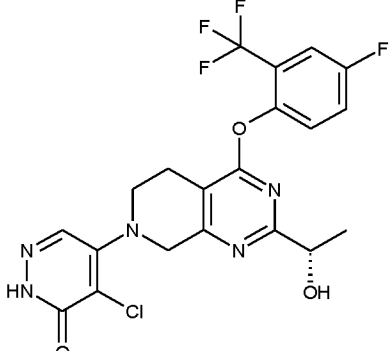
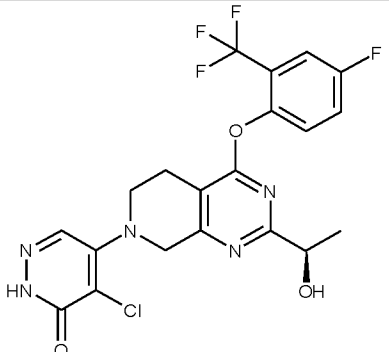
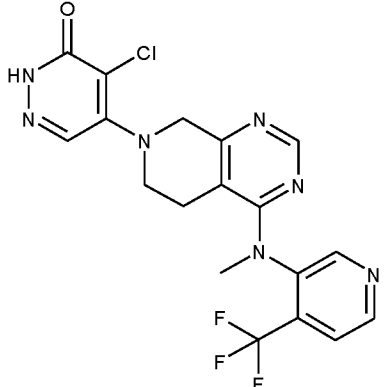
Сполука	Структура
110	 <chem>COC1=NC2=C(N1)CCN2C3=CN=C(N3)C(=O)NC4=C(Cl)N=CN4OC5=CC=C(C=C5)C(F)(F)F</chem>
111	 <chem>COC1=NC2=C(N1)CCN2C3=CN=C(N3)C(=O)NC4=C(Cl)N=CN4OC5=CC=C(C=C5)C(F)(F)F#N</chem>
112	 <chem>Nc1nc2c(nc1)ccn2C3CCN(C3)C4=CN=C(N4)C(=O)NC5=C(Cl)N=CN5OC6=CC=C(C=C6)ClF</chem>
113	 <chem>Nc1nc2c(nc1)ccn2C3CCN(C3)C4=CN=C(N4)C(=O)NC5=C(Cl)N=CN5OC6=CC=C(C=C6)Cl</chem>

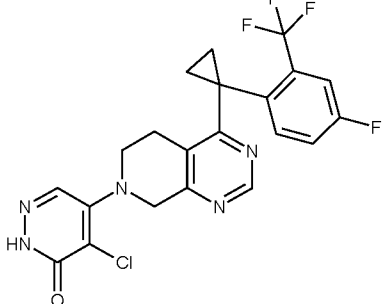
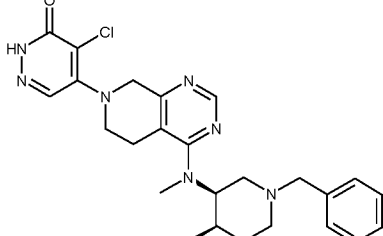
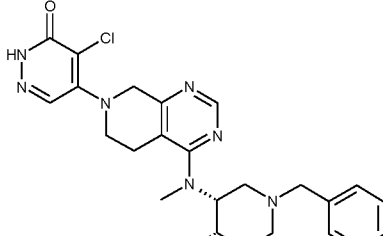
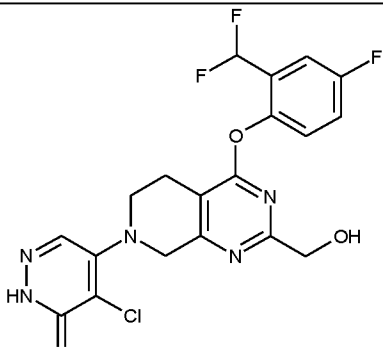
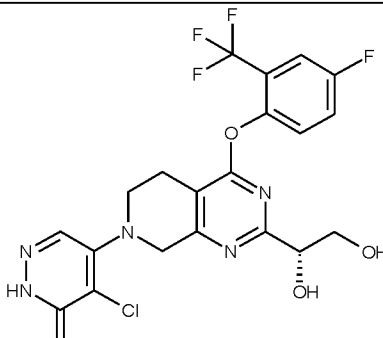
Сполука	Структура
114	 <chem>OCC1=NC2=NC(=O)N=CN=C2N(C1)c3ncnc3C4=CC=C(C=C4)Cl</chem>
115	 <chem>OCCN1=NC2=NC(=O)N=CN=C2N(C1)c3ncnc3C4=CC=C(C=C4)C(F)(F)F</chem>
116	 <chem>N1=NC2=NC(=O)N=CN=C2N(C1)c3ncnc3C4=CC=C(C=C4)C(F)(F)F</chem>
117	 <chem>O=C1NC(=O)N=CN=C1N2CCN(C2)c3ncnc3C4=CC=C(C=C4)Cl</chem>
117a	 <chem>CN1CCN(C1)c2ncnc2C3=CC=C(C=C3)Cl</chem>

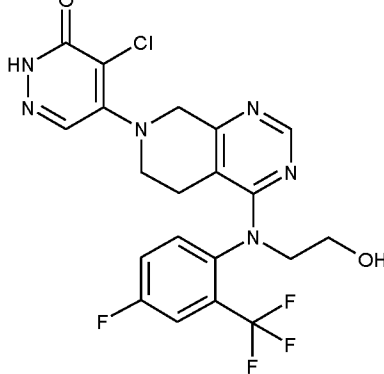
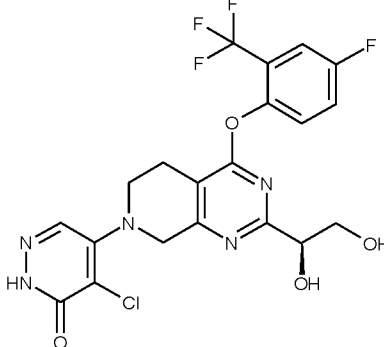
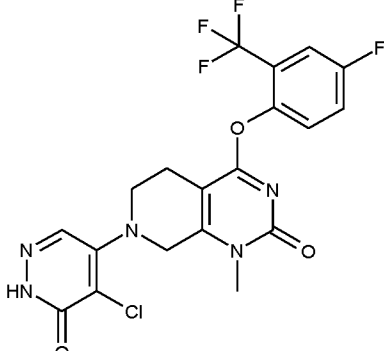
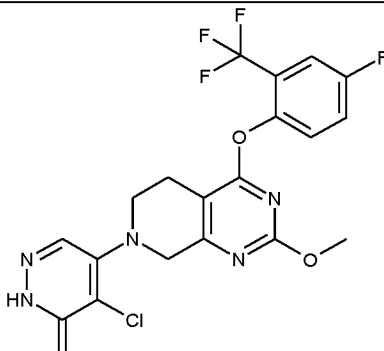
Сполука	Структура
118	 <chem>O=C1NC=CC(=N1)N2CCN(C2)c3ncnc3Oc4ccc(Cl)c(F)c4</chem>
119	 <chem>CC(O)C1=NC2=NC=NC=C2N1CN(C3=CC(=C(C=C3)Cl)OC4=CC=CC=C4)C5=CC(=C(C=C5)C(=O)N5=CN=CN5)Cl</chem>
120	 <chem>CC(F)(F)FCC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2N3CCN(C3)c4ncnc4Oc5ncnc5Cl</chem>
121	 <chem>CC(F)(F)FCC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2N3CCN(C3)c4ncnc4Oc5cc(F)ccc5C6=CC(=C(C=C6)C(=O)N7=CN=CN7)Cl</chem>

Сполука	Структура
122	 <chem>CC(O)C1=NC2=C(N1)N=CN2C3CCN(C3)c4c[nH]c(=O)c4ClC5=CC=C(C=C5)C(F)(F)F</chem>
123	 <chem>CC(O)C1=NC2=C(N1)N=CN2C3CCN(C3)c4c[nH]c(=O)c4ClC5=CC=C(C=C5)C(F)(F)F</chem>
124	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(F)=CC=C1OC2=NC3=NC=NC=C3N2C4CCN(C4)c5c[nH]c(=O)c5Cl</chem>
125	 <chem>OCN1=CN=C(C=C1)C(=O)C2=CC=C(C=C2)C(F)(F)F</chem>

Сполука	Структура
126	 <chem>ClC1=CN=C(N1)C(=O)N2CCN(C2)C3=NC=CC(=C3)C(C)C(F)(F)Fc4ccc(F)cc4</chem>
126a	 <chem>ClC1=CN=C(N1)C(=O)N2CCN(C2)C3=NC=CC(=C3)C(C)C(F)(F)Fc4ccc(F)cc4</chem>
127	 <chem>ClC1=CN=C(N1)C(=O)N2CCN(C2)C3=NC(=C(C(=O)N3C)C)C(C)C(F)(F)Fc4ccc(F)cc4</chem>

Сполука	Структура
128	 <chem>Clc1nc(O)c2nc(O)c3cc(F)(F)Fcc3n2n1</chem>
129	 <chem>Clc1nc(O)c2nc(O)c3cc(F)(F)Fcc(F)c3n2n1</chem>
130	 <chem>Clc1nc(O)c2nc(O)c3cc(F)(F)Fcc(F)c3n2n1</chem>
131	 <chem>Clc1nc(O)c2nc(O)c3cc(F)(F)Fcc(F)c3n2n1</chem>

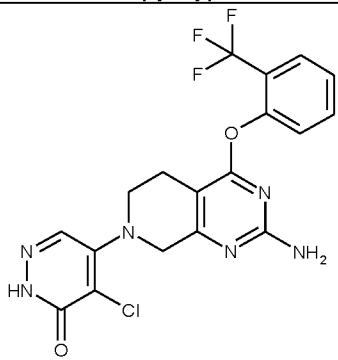
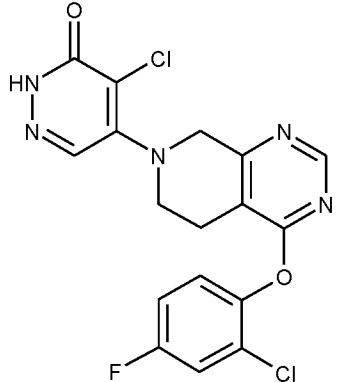
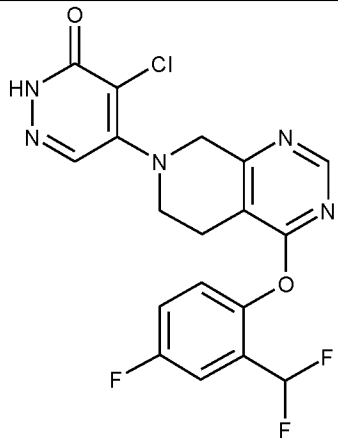
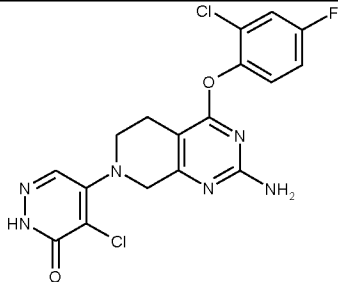
Сполука	Структура
132	
133	
133a	
134	
135	

Сполука	Структура
136	 <chem>Clc1c[nH]c2cc3c1nnc2N3CCN4CCN(C4)CCN5C=C(C=C5)C(F)(F)F</chem>
137	 <chem>Clc1c[nH]c2cc3c1nnc2N3CCN4CCN(C4)CCN5C=C(C=C5)C(F)(F)F</chem> <chem>CC(O)C(O)O</chem>
138	 <chem>Clc1c[nH]c2cc3c1nnc2N3CCN4CCN(C4)CCN5C=C(C=C5)C(F)(F)F</chem> <chem>CN(C)C(=O)N</chem>
139	 <chem>Clc1c[nH]c2cc3c1nnc2N3CCN4CCN(C4)CCN5C=C(C=C5)C(F)(F)F</chem> <chem>COC</chem>

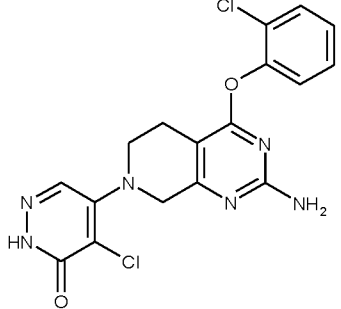
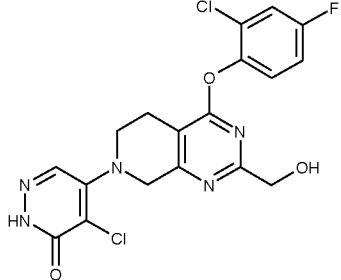
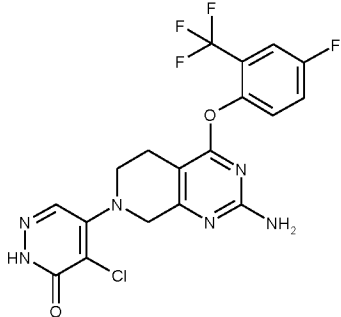
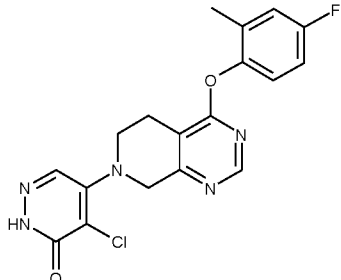
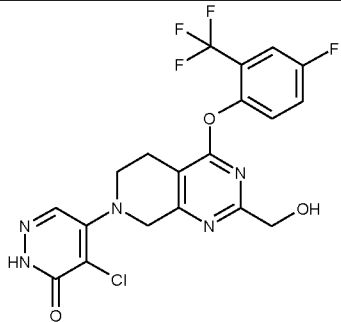
Сполука	Структура
140	

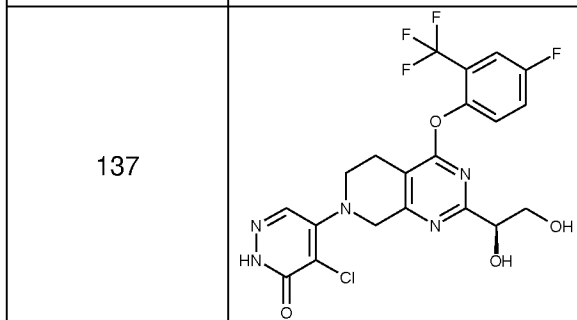
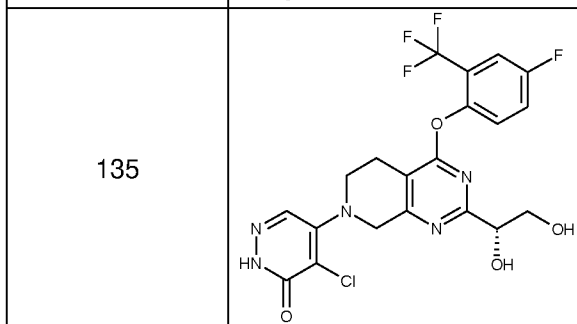
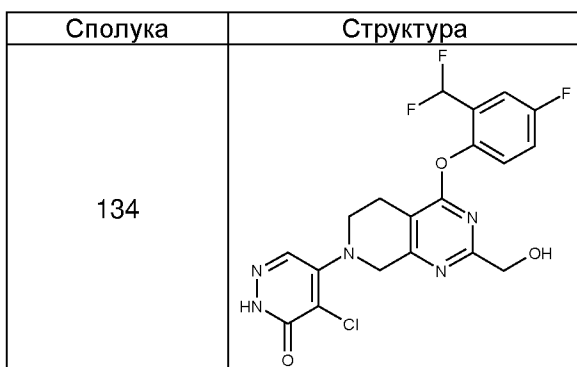
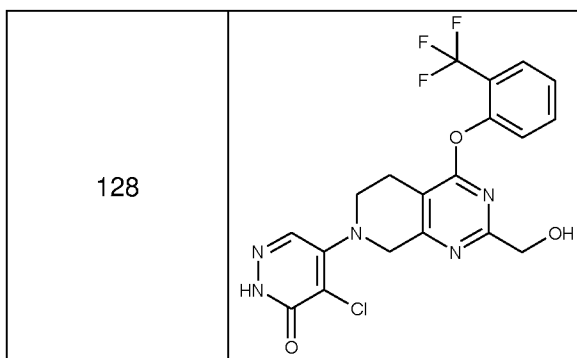
У деяких варіантах реалізації сполука за винаходом вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

Сполука	Структура
100	
101	

Сполука	Структура
102	
104	
105	
112	

Сполука	Структура
---------	-----------

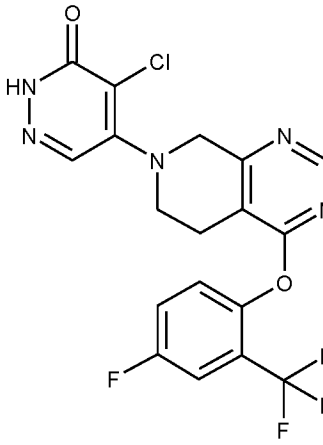
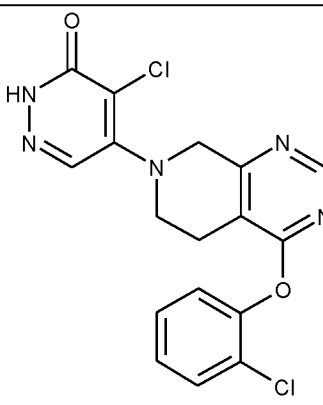
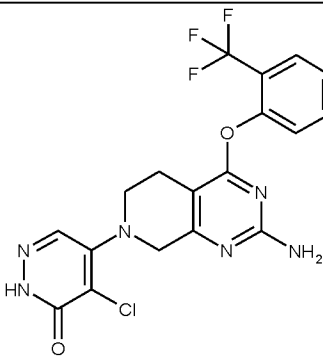
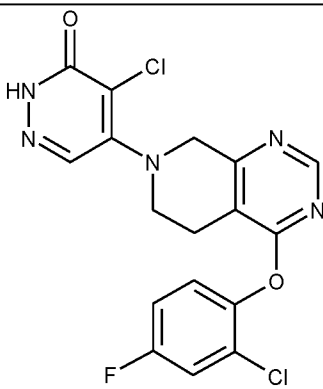
<p>113</p>	
<p>114</p>	
<p>116</p>	
<p>124</p>	
<p>125</p>	

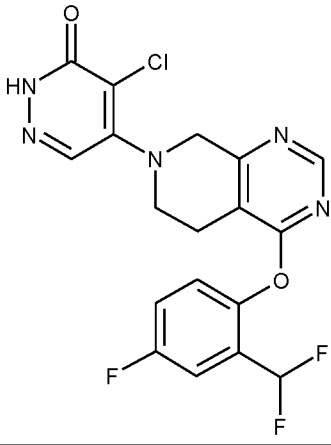
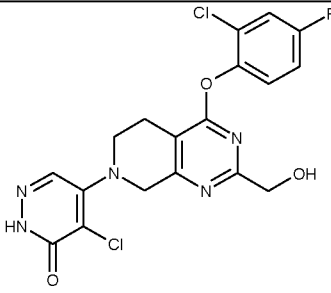
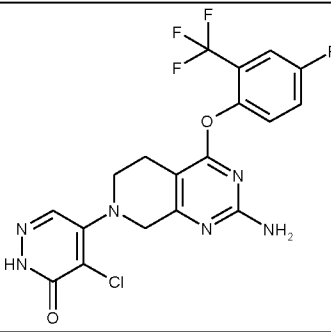
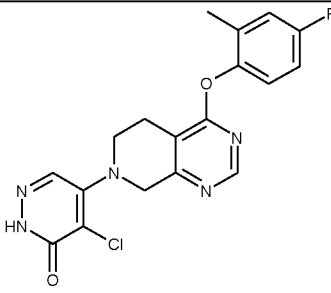
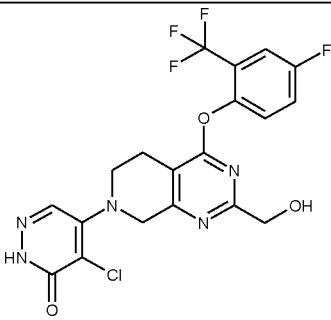


У деяких варіантах реалізації сполука за винаходом вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

5

Сполука	Структура
---------	-----------

Сполука	Структура
100	 <chem>ClC1=CN(C(=O)N1)C2=CN3C(=N2)C(=CN3)OC4=CC=C(C(F)(F)F)C4</chem>
101	 <chem>ClC1=CN(C(=O)N1)C2=CN3C(=N2)C(=CN3)OC4=CC=C(Cl)C4</chem>
102	 <chem>NC1=NC2=C(N1)C(=N2)C(=CN2)C(=CN2)OC3=CC=C(C(F)(F)F)C3Cl</chem>
104	 <chem>ClC1=CN(C(=O)N1)C2=CN3C(=N2)C(=CN3)OC4=CC=C(Cl)C(F)=C4</chem>

Сполука	Структура
105	 <chem>Clc1c2c(ncn2C1CCNCC1)nc3cc(OC4=CC=C(C(F)=C4)F)cc3</chem>
114	 <chem>Clc1c2c(ncn2C1CCNCC1)nc3cc(OC4=CC=C(C=C4)Cl)cc3CO</chem>
116	 <chem>Nc1c2c(ncn2C1CCNCC1)nc3cc(OC4=CC=C(C(F)(F)F)C=C4)cc3Cl</chem>
124	 <chem>Clc1c2c(ncn2C1CCNCC1)nc3cc(OC4=CC=C(C=C4)F)cc3</chem>
125	 <chem>Clc1c2c(ncn2C1CCNCC1)nc3cc(OC4=CC=C(C(F)(F)F)C=C4)cc3CO</chem>



Використовувані в цьому документі позначені штрихуванням або жирним шрифтом, неклинові зв'язки позначають відносну, але не абсолютну стереохімічну конфігурацію (наприклад, не роблять різниці між енантіомерами цього діастереомеру).

5 Використовувані в цьому документі клинові зв'язки заштриховані або виділені жирним шрифтом, що вказує на абсолютну стереохімічну конфігурацію.

У деяких варіантах реалізації винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить сполуку за винаходом і фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах реалізації терапевтичний препарат або фармацевтична композиція сполуки за цим винаходом може бути збагачена для забезпечення переважно одного енантіомера сполуки. Енантіомерно збагачена суміш може містити, наприклад, щонайменше 60 мольних відсотків одного енантіомера або 10 більш переважно щонайменше 75, 90, 95 або навіть 99 мольних відсотків. У деяких варіантах здійснення сполука, збагачена одним енантіомером, по суті не містить іншого енантіомера, де "по суті не містить" означає, що речовина, яка розглядається, становить менш ніж близько 10 %, або менш ніж близько 5 %, або менш ніж близько 4 %, або менш ніж близько 3 %, або менш ніж 15 близько 2 %, або менш ніж близько 1 % в порівнянні з кількістю іншого енантіомера, наприклад, в композиції або суміші сполук. Наприклад, якщо композиція або суміш сполук містить близько 98 г першого енантіомера і близько 2 г другого енантіомера, можна сказати, що вона містить близько 98 мольних відсотків першого енантіомера і тільки близько 2 % другого енантіомера.

У деяких варіантах реалізації терапевтичний препарат або фармацевтична композиція 20 можуть бути збагачені переважно одним діастереомером сполуки за винаходом. Збагачена діастереомером суміш може включати, наприклад, щонайменше 60 мольних відсотків одного діастереомера або більш переважно щонайменше 75, 90, 95 або навіть 99 мольних відсотків.

#### Способи лікування

Неселективні  $\text{Ca}^{2+}$ -проникні канали транзитного рецепторного потенціалу (TRP-Transient Receptor Potential) діють як сенсори, які передають позаклітинні сигнали у внутрішньоклітинне середовище в різних клітинних процесах, включаючи ремоделювання актину і міграцію клітин (Greka et al., Nat Neurosci 6, 837-845, 2003; Ramsey et al., Annu Rev Physiol 68, 619-647, 2006; Montell, Pflugers Arch 451, 19-28, 2005; Clapham, Nature 426, 517-524, 2003). Динамічна 25 перебудова актинового цитоскелета залежить від просторово-часового регульованого  $\text{Ca}^{2+}$ -припливу (Zheng і Poo, Annu Rev Cell Dev Biol 23, 375-404, 2007); Brandman і Meyer, Science 322, 390-395, 2008); Collins і Meyer, Dev Cell 16, 160-161, 2009), а малі ГТФази RhoA і Rac1 служать ключовими модуляторами цих змін (Etienne-Manneville і Hall, Nature 420, 629-635, 2002); Raftopoulou і Hall, Dev Biol 265, 23-32, 2004). RhoA індукуює утворення стресових волокон і осередкових адгезій, тоді як Rac1 опосередковує утворення ламелліподій (Etienne-Manneville і 30 Hall, Nature 420, 629-635, 2002). Канал транзитного рецепторного потенційного катіона, підсімейство C, член 5 (TRPC5) діє спільно з TRPC6, регулюючи приплив  $\text{Ca}^{2+}$ , ремоделювання актину і рухливість клітин в подоцитах і фібробластах нирок. TRPC5-опосередкований  $\text{Ca}^{2+}$  приплив збільшує активність Rac1, тоді як TRPC6-опосередкований приплив  $\text{Ca}^{2+}$  сприяє активності RhoA. Пригнічення генів каналів TRPC6 усуває стресові 35 волокна і зменшує осередкові контакти, забезпечуючи фенотип рухомих мігруючих клітин. Навпаки, пригнічення генів каналів TRPC5 зберігає утворення стресових волокон, забезпечуючи фенотип скорочувальних клітин. Описані в цьому документі результати розкривають консервативний механізм передачі сигналів, за допомогою якого канали TRPC5 і TRPC6 контролюють строго регульований баланс динаміки цитоскелета за допомогою 40 диференціального зв'язування з Rac1 і RhoA.

$\text{Ca}^{2+}$ -залежне ремоделювання актинового цитоскелета є динамічним процесом, який керує міграцією клітин (Wei et al., Nature 457, 901-905, 2009). RhoA і Rac1 діють як перемикачі, відповідальні за перебудову цитоскелета в мігруючих клітинах (Etienne-Manneville and Hall, Nature 420, 629-635, 2002); Raftopoulou and Hall, Dev Biol 265, 23-32, 2004). Активація Rac1 45 опосередковує фенотип рухливих клітин, тоді як активність RhoA сприяє скорочувальному фенотипу (Etienne-Manneville and Hall, Nature 420, 629-635, 2002).  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє центральну роль в регуляції малих ГТФаз (Aspenstrom et al., Biochem J 377, 327-337, 2004). Обмежені в просторі і часі мерехтіння  $\text{Ca}^{2+}$  збагачені біля переднього краю мігруючих клітин (Wei et al., Nature 457, 901-905, 2009). Таким чином, мікродомени  $\text{Ca}^{2+}$  приєднались до локальних сплесків активності 50 Rac1 (Gardiner et al., Curr Biol 12, 2029-2034, 2002; Machacek et al., Nature 461, 99-103, 2009) як критичні події на передньому краї. На сьогоднішній день джерела припливу  $\text{Ca}^{2+}$ , відповідальні за регуляцію ГТФази, залишаються в значній мірі невловимими. Канали TRP (Transient Receptor Potential) генерують обмежені за часом і простором  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали, пов'язані з міграцією клітин в фібробластах і конусах росту нейронів. Зокрема, канали TRPC5 є відомими регуляторами

наведення конуса росту нейронів<sup>1</sup>, і їхня активність в нейронах залежить від активності PI3K і Rac1 (Bezzarides et al., *Nat Cell Biol* 6, 709-720, 2004).

5 Подоцити являють собою нейрональні клітини, які походять з метанефричної мезенхіми ниркового клубочка і необхідні для формування фільтраційного апарату нирок (Somlo and Mundel, *Nat Genet.* 24, 333-335, 2000; Fukasawa et al., *J Am Soc Nephrol* 20, 1491-1503, 2009). Подоцити мають ретельно продуманий репертуар цитоскелетних адаптацій до сигналів навколишнього середовища (Somlo and Mundel, *Nat Genet* 24, 333-335, 2000; Garg et al., *Mol Cell Biol* 27, 8698-8712, 2007; Verma et al., *J Clin Invest* 116, 1346-1359, 2006; Verma et al., *J Biol Chem* 278, 20716-20723, 2003; Barletta et al., *J Biol Chem* 278, 19266-19271, 2003; Holzman et al., *Kidney Int* 56, 1481-1491, 1999; Ahola et al., *Am J Pathol* 155, 907-913, 1999; Tryggvason і Wartiovaara, *N Engl J Med* 354, 1387-1401, 2006; Schnabel і Farquhar, *J Cell Biol* 111, 1255-1263, 1990; Kurihara et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7075-7079, 1992). Ранні події пошкодження подоцитів характеризуються порушенням регуляції актинового цитоскелета (Faul et al., *Trends Cell Biol* 17, 428-437, 2007; Takeda et al., *J Clin Invest* 108, 289-301, 2001; Asanuma et al., *Nat Cell Biol* 8, 485-491, 2006) і гомеостазу Ca<sup>2+</sup> (Hunt et al., *J Am Soc Nephrol* 16, 1593-1602, 2005; Faul et al., *Nat Med* 14, 931-938, 2008). Ці зміни пов'язані з початком протеїнурії, втратою альбуміну в сечовий простір і, в кінцевому підсумку, з нирковою недостатністю (Tryggvason і Wartiovaara, *N Engl J Med* 354, 1387-1401, 2006). Вазоактивний гормон ангіотензин II викликає приплив Ca<sup>2+</sup> у подоцити, і тривале лікування призводить до втрати стресових волокон (Hsu et al., *J Mol Med* 86, 1379-1394, 2008). Хоча існує визнаний зв'язок між припливом Ca<sup>2+</sup> і реорганізацією цитоскелета, механізми, за допомогою яких подоцити сприймають і трансдукують позаклітинні сигнали, які модулюють форму і рухливість клітин, залишаються невловимими. Мутації каналу TRP Canonical 6 (TRPC6) були пов'язані з пошкодженням подоцитів (Winn et al., *Science* 308, 1801-1804, 2005; Reiser et al., *Nat Genet* 37, 739-744, 2005; Moller et al., *J Am Soc Nephrol* 18, 29-36, 2007; Hsu et al., *Biochim Biophys Acta* 1772, 928-936, 2007), але мало що відомо про конкретні шляхи, які регулюють цей процес. Більше того, TRPC6 має близьку гомологію з шістьма іншими членами сімейства каналів TRPC (Ramsey et al., *Annu Rev Physiol* 68, 619-647, 2006; Clapham, *Nature* 426, 517-524, 2003). Канали TRPC5 протидіють активності каналу TRPC6, щоб контролювати строго регульований баланс динаміки цитоскелета за допомогою диференціального зв'язування з окремими малими ГТФазами.

#### Протеїнурія

Протеїнурія являє собою патологічний стан, при якому білок присутній в сечі. Альбумінурія являє собою різновид протеїнурії. Мікроальбумінурія виникає, коли нирки виділяють невелику кількість альбуміну з сечею. В правильно функціонуючому організмі альбумін зазвичай не присутній в сечі, тому що він затримується в кровотоці нирками. Мікроальбумінурія діагностується або при 24-годинному зборі сечі (від 20 до 200 мкг/хв), або, що більш часто, при підвищених концентраціях (від 30 до 300 мг/л) як мінімум в двох випадках. Мікроальбумінурія може бути передвісником діабетичної нефропатії. Рівень альбуміну вище цих значень називається макроальбумінурією. Суб'єкти з певними станами, наприклад діабетичною нефропатією, можуть прогресувати від мікроальбумінурії до макроальбумінурії і досягати нефротичного діапазону (> 3,5 г/24 години) по мірі того, як захворювання нирок досягає пізньої стадії.

#### Причини протеїнурії

Протеїнурія може бути пов'язана з низкою станів, включаючи осередковий сегментарний гломерулосклероз, нефропатію IgA, діабетичну нефропатію, вовчаковий нефрит, мембранопроліферативний гломерулонефрит, прогресуючий (серповидний) гломерулонефрит і мембранозний гломерулонефрит.

#### А. Фокальний сегментарний гломерулосклероз (FSGS)

50 Фокальний сегментарний гломерулосклероз (FSGS) являє собою захворювання, яке вражає фільтруючу систему нирок (клубочки), викликаючи серйозні рубці. FSGS являє собою одну з багатьох причин захворювання, відомого як нефротичний синдром, що виникає, коли білок крові потрапляє в сечу (протеїнурія).

Доступно дуже мало способів лікування для пацієнтів з FSGS. Багато пацієнтів отримують стероїдні схеми, більшість з яких має дуже серйозні побічні ефекти. Деякі пацієнти позитивно реагують на імунодепресанти, а також на препарати артеріального тиску, які показали зниження рівня білка в сечі. На сьогоднішній день не існує загальноприйнятих ефективних способів лікування або терапії, і немає схвалених FDA ліків для лікування FSGS. Отже, бажані більш ефективні способи зменшення або пригнічення протеїнурії.

#### В. IgA-нефропатія

IgA-нефропатія (також відома як IgA-нефрит, IgAN, хвороба Бергера і синфарингітний гломерулонефрит) являє собою форму гломерулонефриту (запалення клубочків нирок). IgA-нефропатія являє собою найпоширеніший гломерулонефрит у всьому світі. Первинна IgA-нефропатія характеризується відкладенням IgA-антитіл в клубочках. Є й інші захворювання, пов'язані з гломерулярними відкладеннями IgA, найбільш поширеним з яких є пурпура Геноха-Шенлейна (HSP-Nepoch-Schönlein purpura), яку багато хто вважає системною формою IgA-нефропатії. Пурпура Геноха-Шенлейна проявляється характерним пурпуровим висипанням на шкірі, артритом і болями в животі і частіше зустрічається у молодих людей (16-35 років). HSP асоціюється з більш сприятливим прогнозом, ніж IgA-нефропатія. При IgA-нефропатії спостерігається повільне прогресування хронічної ниркової недостатності в 25-30 % випадків протягом 20 років.

#### С. Діабетична нефропатія

Діабетична нефропатія, також відома як синдром Кімеллшталя-Вільсона і інтеркапілярний гломерулонефрит, являє собою прогресуюче захворювання нирок, викликане ангіопатією капілярів в клубочках нирок. Для нього характерні нефротичний синдром і дифузний гломерулосклероз. Це пов'язано з давнім цукровим діабетом і є основною причиною діалізу. Найбільш ранньою виявленою зміною перебігу діабетичної нефропатії є потовщення клубочків. На цьому етапі нирки можуть почати виділяти з сечею більше сироваткового альбуміну, ніж зазвичай. По мірі прогресування діабетичної нефропатії все більша кількість клубочків руйнується вузловим гломерулосклерозом, і кількість альбуміну, що виділяється з сечею, збільшується.

#### Д. Вовчаковий нефрит

Вовчаковий нефрит являє собою захворювання нирок, яке є ускладненням системного червоного вовчака. Вовчаковий нефрит виникає, коли в нирках накопичуються антитіла і комплемент, викликаючи запалення. Він часто викликає протеїнурію і може швидко прогресувати до ниркової недостатності. Азотні відходи накопичуються в кровотоці. Системний червоний вовчак викликає різні порушення внутрішніх структур нирок, в тому числі інтерстиціальний нефрит. Вовчаковий нефрит вражає приблизно 3 з 10 000 людей.

#### Е. Мембранопроліферативний гломерулонефрит I/II/III

Мембранопроліферативний гломерулонефрит являє собою тип гломерулонефриту, викликаний відкладеннями в мезангіумі клубочків нирок і потовщенням базальної мембрани, активацією комплементу і пошкодженням клубочків. Існує три типи мембранопроліферативного гломерулонефриту. Тип I викликається імунними комплексами, що відкладаються в нирках, і вважається, що він пов'язаний з класичним шляхом комплементу. Тип II аналогічний типу I, проте вважається, що він пов'язаний з альтернативним шляхом комплементу. Тип III дуже рідкісний і характеризується сумішшю субепітеліальних відкладень і типових патологічних проявів хвороби Типу I.

#### Ф. Прогресуючий (серповидний) гломерулонефрит

Прогресуючий (серповидний) гломерулонефрит (PG-Progressive (crescentic) glomerulonephritis) являє собою синдром нирок, який, якщо його не лікувати, швидко прогресує в гостру ниркову недостатність і смерть протягом декількох місяців. У 50 % випадків PG асоційований з основним захворюванням, як-от синдром Гудпасчера, системний червоний вовчак або гранулематоз Вегенера; інші випадки ідіопатичні. Незалежно від першопричини, PG включає серйозне пошкодження клубочків нирок, причому багато з них містять характерні рубці у формі півмісяця. Пацієнти з PG страждають на гематурію, протеїнурію, а іноді і гіпертонію і набряки. Клінічна картина відповідає нефритичному синдрому, хоча ступінь протеїнурії може іноді перевищувати 3 г/24 години, діапазон, пов'язаний з нефротичним синдромом. За відсутності лікування захворювання може прогресувати до зменшення об'єму сечі (олігурія), що пов'язано з порушенням функції нирок.

#### Г. Мембранозний гломерулонефрит

Мембранозний гломерулонефрит (MGN-Membranous glomerulonephritis) являє собою повільно прогресуюче захворювання нирок, що вражає в основному пацієнтів у віці від 30 до 50 років, як правило, представників білої європеїдної раси. Він може перерости в нефротичний синдром. MGN викликається циркулюючим імунним комплексом. Поточні дослідження показують, що більшість імунних комплексів формується шляхом зв'язування антитіл до антигенів *in situ* з базальною мембраною клубочка. Зазначені антигени можуть бути ендогенними в базальній мембрані або депонуватися з великого кола кровообігу.

#### Вимірювання рівня білка в сечі

Рівні білка в сечі можна виміряти за допомогою методів, відомих в цій області. До недавнього часу для точного вимірювання білка був потрібний 24-годинний збір сечі. При 24-

годинному зборі пацієнт мочиться в контейнер, який зберігається в холодильнику між походами в ванну. Пацієнту пропонується почати збір сечі вранці після першого походу в туалет. У ємність збирають кожну краплю сечі на залишок дня. На наступний ранок пацієнт додає перше сечовипускання після пробудження, і збір завершено.

Зовсім недавно дослідники виявили, що один зразок сечі може надати необхідну інформацію. У новітній методиці кількість альбуміну в зразку сечі порівнюється з кількістю креатиніну, побічного продукту нормального розпаду м'язів. Це вимірювання називається відношенням альбуміну до креатиніну в сечі (UACR-urine albumin-to-creatinine ratio). Зразок сечі, що містить більше 30 міліграмів альбуміну на кожен грам креатиніну (30 мг/г), є попередженням про можливу проблему. Якщо лабораторний тест перевищує 30 мг/г, слід провести ще один тест UACR через 1-2 тижні. Якщо другий тест також показує високий рівень білка, у людини стійка протеїнурія, ознака зниження функції нирок, і йому необхідно пройти додаткові тести для оцінки функції нирок.

Тести, які вимірюють кількість креатиніну в крові, також покажуть, чи ефективно нирки суб'єкта видаляють відходи. Занадто багато креатиніну в крові є ознакою ураження нирок. Лікар може використовувати вимір креатиніну, щоб оцінити, наскільки ефективно нирки фільтрують кров. Цей розрахунок називається розрахунковою швидкістю клубочкової фільтрації або eGFR (estimated glomerular filtration rate). Хронічна хвороба нирок присутня, коли eGFR менше 60 мілілітрів на хвилину (мл/хв).

#### TRPC5

TRPC являє собою сімейство тимчасових катіонних каналів рецепторного потенціалу у тварин. TRPC5 є підтипом сімейства TRPC потенційних іонних каналів рецепторів ссавців. Три приклади TRPC5 показані нижче в Таблиці 1:

Таблиця 1

Ортологи TRPC5 з трьох різних видів разом з їх номерами доступу в GenBank

Види	Нуклеїнова кислота	Амінокислота	Ідентифікатор гена
Homo sapiens	NM_012471.2	NP_036603.1	7224
Mus musculus	NM_009428.2	NP_033454.1	22067
Rattus norvegicus	NM_080898.2	NP_543174.1	140933

25

Відповідно, у певних варіантах реалізації винахід забезпечує способи лікування або зниження ризику розвитку захворювання або стану, вибраного з захворювання нирок, легеневої артеріальної гіпертензії, тривоги, депресії, раку, діабетичної ретинопатії або болю, що включають введення суб'єкту при необхідності терапевтично ефективною кількістю сполуки за винаходом (наприклад, сполуки структурної формули I) або фармацевтичної композиції, що містить вказану сполуку.

30

У деяких варіантах реалізації захворювання являє собою захворювання нирок, тривожний стан, депресію, рак або діабетичну ретинопатію.

35

У деяких варіантах реалізації захворювання або стану являє собою захворювання нирок, вибране з осередкового сегментарного гломерулосклерозу (FSGS), діабетичної нефропатії, синдрому Альпорта, гіпертонічної хвороби нирок, нефротичного синдрому, стероїдно-резистентного нефротичного синдрому, хвороби мінімальних змін, мембранозної нефропатії, ідіопатичної мембранозної нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту (MPGN), MPGN, опосередкованого імунним комплексом, MPGN, опосередкованого комплементом, вовчакового нефриту, постінфекційного гломерулонефриту, захворювання тонкої базальної мембрани, мезангіального проліферативного гломерулонефриту, амілоїдозу (первинного), c1q-нефропатії, швидко прогресуючого GN, захворювання anti-GBM, гломерулонефриту C3, гіпертонічного нефросклерозу або нефропатії IgA. У деяких варіантах реалізації захворювання нирок являє собою протеїнуричне захворювання нирок. У деяких варіантах реалізації захворювання нирок являє собою мікроальбумінурію або макроальбумінуричне захворювання нирок.

40

У деяких варіантах реалізації захворювання або стану, що підлягає лікуванню, являє собою легенеvu артеріальну гіпертензію.

45

У деяких варіантах реалізації захворювання або стану, що підлягає лікуванню, являє собою біль, вибраний з невропатичного болю і вісцерального болю.

50

У деяких варіантах реалізації захворювання або стан являє собою рак, вибраний з хіміорезистентної карциноми молочної залози, адриаміцинорезистентного раку молочної залози, хіміорезистентного колоректального раку, медуллобластоми і ангиогенезу пухлини.

5 У винаході також запропоновані способи лікування або зниження ризику розвитку тривожності або депресії або раку, які включають введення суб'єкту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості сполуки за винаходом (наприклад, сполуки Формули I) або фармацевтичної композиції, що містить вказану сполуку.

10 У деяких варіантах реалізації захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою пов'язаний з трансплантатом FSGS, пов'язаний з трансплантатом нефротичний синдром, пов'язану з трансплантатом протеїнурию, холестатичне захворювання печінки, полікістоз нирок, аутосомно-домінантну полікістозну хворобу нирок (ADPKD-autosomal dominant polycystic kidney disease), ожиріння, інсулінорезистентність, діабет II типу, предіабет, метаболічний синдром, неалкогольну жирову хворобу печінки (NAFLD-non-alcoholic fatty liver disease) або неалкогольний стеатогепатит (NASH-non-alcoholic steatohepatitis).

15 Суб'єкти лікування

В одному аспекті винаходу суб'єкт вибирається на підставі того, що у нього є, або він схильний до ризику розвитку, захворювання нирок, легеневої артеріальної гіпертензії, тривожного стану, депресії, раку, діабетичної ретинопатії або болю. В іншому аспекті суб'єкт вибирається на підставі того, що у нього є, або він схильний до ризику розвитку, захворювання нирок, тривожного стану, депресії, раку, діабетичної ретинопатії. В іншому аспекті винаходу суб'єкт вибирається на підставі того, що він має, або схильний до ризику розвитку, болю, невропатичного болю, вісцерального болю, пов'язаного з трансплантатом FSGS, пов'язаного з трансплантатом нефротичного синдрому, пов'язаної з трансплантатом протеїнурії, холестатичного захворювання печінки, полікістозу нирок, аутосомно-домінантного полікістозу нирок (ADPKD), ожиріння, інсулінорезистентності, діабету II типу, предіабету, метаболічного синдрому, неалкогольної жирової хвороби печінки (NAFLD) або неалкогольного стеатогепатиту (NASH).

Суб'єкти, які мають протеїнурію або схильні до ризику її розвитку, включають людей з діабетом, гіпертензією або з певним сімейним минулим. У Сполучених Штатах діабет є провідною причиною термінальної стадії ниркової недостатності (ESRD-end-stage renal disease). При діабеті як 1-го, так і 2-го типу альбумін в сечі є однією з перших ознак погіршення функції нирок. По мірі зниження функції нирок кількість альбуміну в сечі збільшується. Ще один фактор ризику розвитку протеїнурії являє собою гіпертензія. Протеїнурія у людини з високим кров'яним тиском є індикатором зниження функції нирок. Якщо гіпертензія не контролюється, у людини може розвинути повна ниркова недостатність. Афроамериканці частіше, ніж європейці, мають високий кров'яний тиск і у них розвиваються проблеми з нирками, навіть якщо їх кров'яний тиск лише злегка підвищений. До інших груп ризику протеїнурії відносяться американські індіанці, іспаномовні емігранти з Південної Америки (яких в Америці називають "латинос"), американці з островів Тихого океану, літні люди і люди з надмірною вагою.

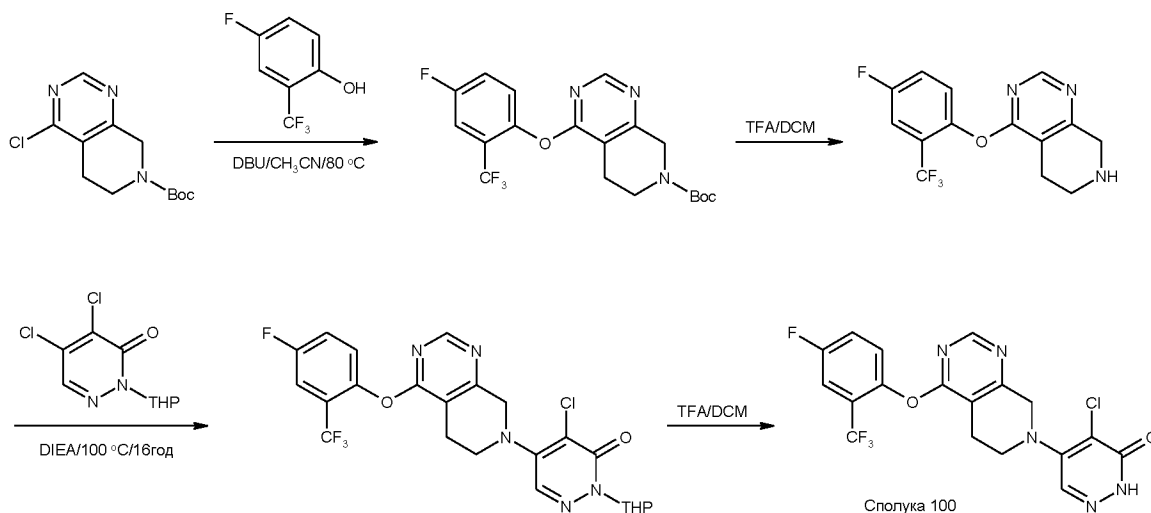
40 В одному з аспектів винаходу суб'єкт вибирається на підставі того, що він має протеїнурію або схильний до ризику її розвитку. Суб'єкт, у якого є протеїнурія або є ризик її розвитку, - це людина, яка має один або кілька симптомів цього стану. Симптоми протеїнурії відомі фахівцям в цій області і включають, без обмеження, велику кількість білка в сечі, через що в унітазі вона може виглядати пінистою. Втрата великої кількості білка може призвести до набряку, при якому можуть виникати набряки рук, ніг, живота або обличчя. Це ознаки значної втрати білка і вказують на прогресування захворювання нирок. Лабораторні дослідження - єдиний спосіб з'ясувати, чи є білок в сечі суб'єкта до того, як відбудеться значне пошкодження нирок.

Способи ефективні для безлічі суб'єктів, включаючи ссавців, наприклад людей і інших тварин, як-от лабораторні тварини, наприклад, миші, пацюки, кролики або мавпи, або домашніх і сільськогосподарських тварин, наприклад кішок, собак, кіз, овець, свиней, корів або коней. У деяких варіантах реалізації суб'єкт являє собою ссавця, в деяких варіантах реалізації суб'єкт являє собою людину.

#### ПРИКЛАДИ

55 Винахід буде додатково описано в наступних прикладах, які не обмежують обсяг винаходу, описаний у формулі винаходу.

Приклад 1. Приклад Сполуки 100



трет-бутил 4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил-4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (400 мг, 1,48 ммоль, 1 екв.) і 4-фтор-2-(трифторметил)фенолу (400,6 мг, 2,22 ммоль, 1,5 екв.) в ацетонітрилі (10 мл) додавали DBU (451,5 мг, 2,97 ммоль, 2,00 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували 2 год. при 80 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (3 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (PE/EtOAc 2:1), отримуючи трет-бутил 4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат (110 мг, 17,94 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин

До перемішаного розчину трет-бутил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (110 мг, 0,27 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл, 13,46 ммоль, 50,59 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (ДХМ/MeOH 12:1), отримуючи 4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин (50 мг, 59,98 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

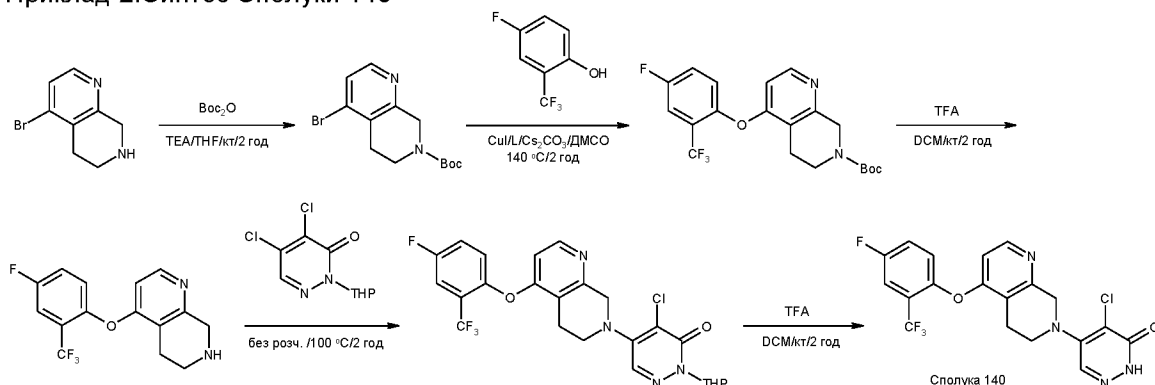
До перемішаного розчину 4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (50 мг, 0,16 ммоль, 1 екв.) в DIEA (2 мл) додавали 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (47,5 мг, 0,19 ммоль, 1,19 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували 2 год. при 100 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (PE/EtOAc 2:1), отримуючи 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (40 мг, 47,65 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (40 мг, 0,08 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл, 13,46 ммоль, 177,00 екв.) по краплях при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (40 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30 × 150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 ммоль/л NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 18 % В до 47 % В за 7 хвилин; 220 нм; Rt: 6,22 хв) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-

(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (8,6 мг, 25,59 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 2. Синтез Сполуки 140



5 Трет-бутил-4-бром-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилат

До розчину 4-бром-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридину (250 мг, 1,173 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (10 мл, 123,430 ммоль, 105,20 екв.) додавали Voc<sub>2</sub>O (512,13 мг, 2,347 ммоль, 2,00 екв.) і ТЕА (474,90 мг, 4,693 ммоль, 4 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою

10 препаративної-ТСХ (РЕ/ЕА 5/1), отримуючи трет-бутил-4-бром-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилат (210 мг, 57,15 %) у вигляді світло-жовтої олії.

Трет-бутил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилат

15 До розчину трет-бутил-4-бром-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилату (210 мг, 0,671 ммоль, 1 екв.) і 4-фтор-2-(трифторметил)фенолу (241,52 мг, 1,341 ммоль, 2 екв.) в ДМСО (10 мл) додавали Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (873,86 мг, 2,682 ммоль, 4 екв.), 2-(диметиламіно)оцтову кислоту (41,46 мг, 0,402 ммоль, 0,6 екв.) і CuI (76,62 мг, 0,402 ммоль, 0,60 екв.). Після перемішування протягом 4 годин при 120 °С в атмосфері азоту отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ, елюювали РЕ/ЕА (5/1), з отриманням

20 трет-бутил 4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилату (100 мг, 36,17 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин

25 До розчину трет-бутил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-карбоксилату (150 мг, 0,364 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл, 157,300 ммоль, 432,46 екв.) додавали ТФУ (414,75 мг, 3,637 ммоль, 10 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок використовували в подальшій стадії.

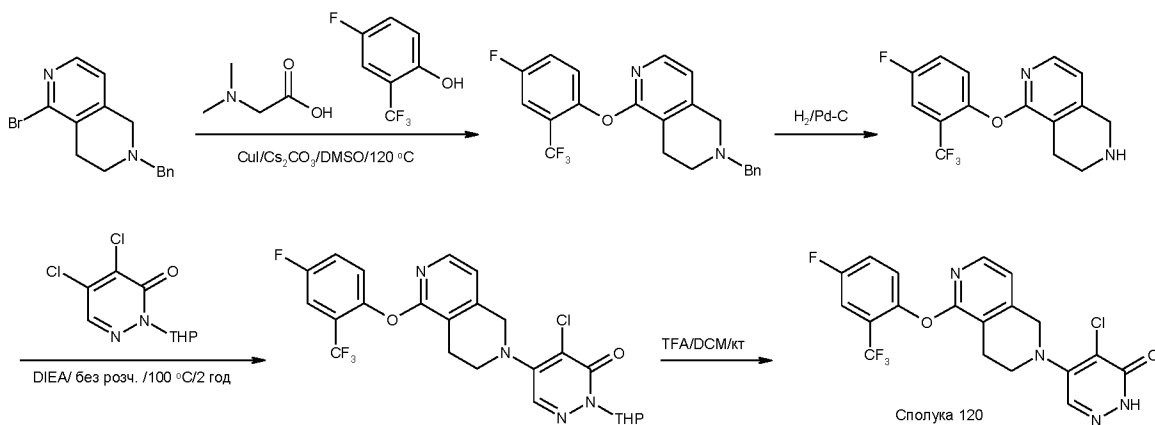
4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

30 Суміш 4 [4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридину (60 мг, 0,192 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (47,86 мг, 0,192 ммоль, 1,00 екв.) в DIEA (49,67 мг, 0,384 ммоль, 2 екв.) перемішували протягом 2 годин при 100 °С в атмосфері N<sub>2</sub>. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (РЕ/ЕА 1/1), з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 99,15 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

40 До розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 0,191 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл, 157,300 ммоль, 825,67 екв.) додавали ТФУ (217,23 мг, 1,905 ммоль, 10,00 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Сирий продукт (150 мг) очищали за допомогою препаративної-ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30\*150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хвилин; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5,6,7,8-тетрагідро-1,7-нафтиридин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (42,9 мг, 51,09 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 3. Синтез Сполуки 120



### 2-Бензил-5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин

До перемішуваної суміші 2-бензил-5-бром-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридину (250 мг, 0,825 ммоль, 1 екв.) і 2-(диметиламіно)оцтової кислоти (170,05 мг, 1,649 ммоль, 2,00 екв.) в ДМСО (5 мл) додавали 4-фтор-2-(трифторметил)фенол (89,10 мг, 0,495 ммоль, 0,6 екв.) і CuI (94,22 мг, 0,495 ммоль, 0,6 екв.) при кімнатній температурі. Потім додавали Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1074,59 мг, 3,298 ммоль, 4 екв.) при кімнатній температурі. Кінцеву реакційну суміш опромінювали мікрохвильовим випромінюванням протягом 1 години при 120 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Сирий продукт очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30 × 150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; Градієнт: від 18 % В до 35 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,12 хв) з отриманням 2-бензил-5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридину (180 мг, 54,25 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

### 5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин

До перемішуваного розчину 2-бензил-5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридину (180 мг) в MeOH (10 мл) додавали Pd/C (20 мг) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 5 годин при кімнатній температурі в атмосфері водню. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (ДХМ/MeOH 12:1) з отриманням 5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридину (100 мг) у вигляді коричневої твердої речовини.

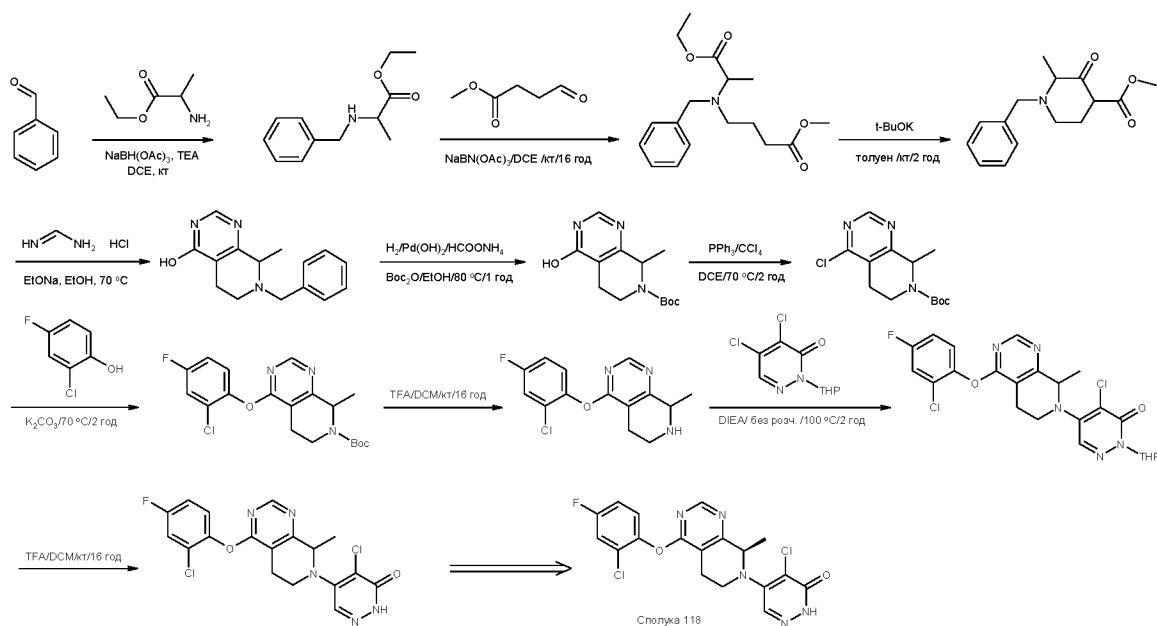
### 4-хлор-5-[5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин-2-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішуваного розчину 5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридину (100 мг, 0,320 ммоль, 1 екв.) в DIEA (0,1 мл) додавали 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (63,81 мг, 0,256 ммоль, 0,8 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 90 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали за допомогою препаративної-ТСХ (ДХМ/MeOH; 12:1) з отриманням 4-хлор-5-[5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин-2-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (130 мг, 77,34 %) у вигляді білої твердої речовини.

### 4-хлор-5-[5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин-2-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішуваного розчину 4-хлор-5-[5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин-2-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (107 мг, 0,204 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміш підлужували до рН 7 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (50 мг) очищали за допомогою препаративної-ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30 × 150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 30 % В до 50 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,55 хв) з отриманням 4-хлор-5-[5-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-1,2,3,4-тетрагідро-2,6-нафтиридин-2-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (60 мг, 66,78 %) у вигляді білої твердої речовини.

### Приклад 4. Синтез Сполуки 118



#### Етил 2-(бензиламіно)пропаноат

До перемішаного розчину бензальдегіду (8 г, 75,384 ммоль, 1 екв.) і TEA (7,63 г, 75,384 ммоль, 1 екв.) в ДХЕ (100 мл, 1263,149 ммоль, 16,76 екв.) додавали TEA (7,63 г, 75,384 ммоль, 1 екв.) і NaBH(OAc)<sub>3</sub> (31,95 г, 150,767 ммоль, 2 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при к.т. протягом ночі. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Реакційну суміш екстрагували ДХМ (2 × 150 мл). Об'єднані органічні шари промивали розчином (1 × 90 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску, отримуючи етил 2-(бензиламіно)пропаноат (12 г, 76,80 %) у вигляді безбарвної олії.

#### Метил-4-[бензил(1-етокси-1-оксопропан-2-іл)аміно]бутаноат

До перемішаного розчину етил 2-(бензиламіно)пропаноату (8 г, 38,596 ммоль, 1 екв.) і метил 4-оксобутаноату (4,48 г, 38,596 ммоль, 1,00 екв.) в ДХЕ (120 мл, 1515,779 ммоль, 39,27 екв.) додавали TEA (3,91 г, 38,596 ммоль, 1 екв.) і NaBH(OAc)<sub>3</sub> (16,36 г, 77,193 ммоль, 2 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при к.т. протягом ночі. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Реакційну суміш екстрагували ДХМ (2 × 150 мл). Об'єднані органічні шари промивали розчином (1 × 90 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску з отриманням метил 4-[бензил(1-етокси-1-оксопропан-2-іл)аміно]бутаноату (10 г, 84,29 %) у вигляді безбарвної олії.

#### Метил 1-бензил-2-метил-3-оксопіперидин-4-карбоксилат

До перемішаного розчину метил 4-[бензил(1-етокси-1-оксопропан-2-іл)аміно]бутаноату (8 г, 26,026 ммоль, 1 екв.) в толуені (100 мл) додавали t-BuOK (5,00 г, 52,051 ммоль, 2 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 80 °C протягом 2 годин. Бажаний продукт був виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (від 5:1 до 2:1) з отриманням метил 1-бензил-2-метил-3-оксопіперидин-4-карбоксилату (6,5 г, 95,57 %) у вигляді білої твердої речовини.

#### 7-бензил-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо [3,4-d] піримідин-4-ол

До перемішаного розчину метил 1-бензил-2-метил-3-оксопіперидин-4-карбоксилату (6 г, 22,960 ммоль, 1 екв.) в EtOH (80 мл, 1377,083 ммоль, 59,98 екв.) додавали трет-БуONa. (4,41 г, 45,921 ммоль, 2 екв.) і гідрохлорид метанімідаміду (3,70 г, 45,921 ммоль, 2,00 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 80 °C протягом 2 годин; бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (від 3:1 до 2:1) з отриманням 7-бензил-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-4-олу (5 г, 85,29 %) у вигляді білої твердої речовини.

#### Трет-бутил 4-гідрокси-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До розчину 7-бензил-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-4-олу (5 г, 19,583 ммоль, 1 екв.) в EtOH (60 мл, 1032,812 ммоль, 52,74 екв.) додавали Вос<sub>2</sub>О (8,55 г, 39,166 ммоль, 2 екв.), СН<sub>3</sub>COONa (1,81 г, 23,500 ммоль, 1,2 екв.), Pd(OH)<sub>2</sub>/C (275,01 мг, 1,958 ммоль, 0,1 екв.) в

атмосфері азоту. Суміш гідрували при кімнатній температурі протягом 2 годин в атмосфері водню, фільтрували через шар целіту і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 4-гідрокси-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4,5 г, 86,61 %) у вигляді білої твердої речовини.

5 Трет-бутил 4-хлор-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-гідрокси-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4,5 г, 16,961 ммоль, 1 екв.) і  $\text{PPh}_3$  (6,67 г, 25,442 ммоль, 1,5 екв.) в ДХЕ (60 мл, 0,606 ммоль, 0,04 екв.) додавали  $\text{SnCl}_4$  (5,22 г, 33,922 ммоль, 2 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 70 °С протягом 2 годин. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (7:1), з отриманням трет-бутил 4-хлор-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4 г, 83,11 %) у вигляді білої твердої речовини.

15 Трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-хлор-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4 г, 14,096 ммоль, 1 екв.) і 2-хлор-4-фторфенолу (2,07 г, 14,096 ммоль, 1 екв.) в ДМФА (50 мл) додавали  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,90 г, 28,193 ммоль, 2 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 70 °С протягом 1 години; Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (1:1), з отриманням трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4 г, 72,05 %) у вигляді білої твердої речовини.

20 4-(2-Хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин

25 До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (4 г, 1 екв.) в ДХМ (20 мл) додавали ТФУ (4 мл) по краплях/частинами при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*] піримідину (2,7 г, 90,51 %) у вигляді твердої речовини брудно-білого кольору.

30 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

35 До перемішаного розчину 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (1 г, 3,404 ммоль, 1 екв.) в DIEA (1 мл) додавали порціями 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (0,85 г, 3,404 ммоль, 1 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 100 °С протягом ночі. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (від 1:1 до 1:2), з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (1 г, 58,01 %) у вигляді білої твердої речовини.

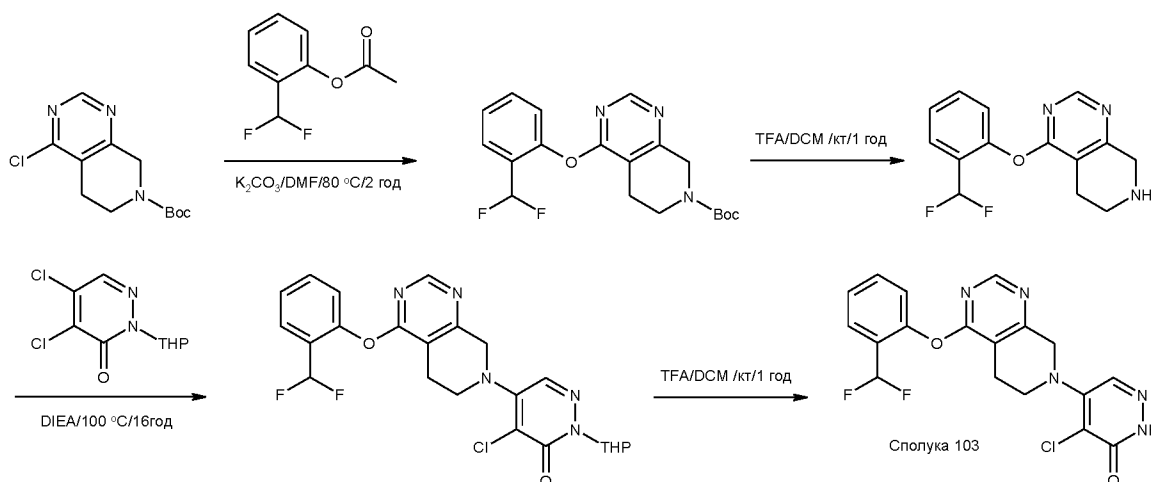
40 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

45 До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (1 г, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (2 мл) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Цю суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Бажаний продукт може бути виявлений за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску, з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (600 мг, 71,95 %) у вигляді білої твердої речовини.

50 4-хлор-5-[(8R)-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

55 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (250 мг, 1 екв.) розділяли за допомогою препаративної хіральної ВЕРХ (колонка: CHIRALPAK IG, 20\*250 мм, 5 мкм; рухома фаза А: гексан:ДХМ = 3:1 (0,1 % FA) - - ВЕРХ, рухома фаза В: EtOH - ВЕРХ; швидкість потоку: 20 мл/хв; градієнт: від 15 до 15 В за 19 хвилин; 220/254 нм; RT1:13,016; RT2:16,004) з отриманням 4-хлор-5-[(8R)-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-8-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (144 мг, 57,60 %) у вигляді білої твердої речовини.

60 Приклад 5. Синтез Сполуки 103



Трет-Бутил 4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (800 мг, 2,966 ммоль, 1 екв.) і 2-(дифторметил)фенілацетату (1104,26 мг, 5,932 ммоль, 2,00 екв.) в ДМФА (20 мл) додавали  $K_2CO_3$  (1229,72 мг, 8,898 ммоль, 3 екв.) порціями при 80 °С в атмосфері азоту. Суміш перемішували протягом 2 годин. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Реакцію гасили водою при кімнатній температурі. Суміш екстрагували  $EtOAc$  (3 × 50 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (3 × 100 мл), сушили над безводним  $Na_2SO_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах: колонка, силікагель С18; рухома фаза, MeOH у воді, градієнт від 10 % до 50 % за 10 хв; детектор, УФ 254 нм. з отриманням трет-бутил 4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (900 мг, 80,41 %) у вигляді твердої речовини брудно-білого кольору.

4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (900 мг, 2,385 ммоль, 1 екв.) в ДХМ по краплях додавали 3,3,3-трифторпропанову кислоту (3 мл, 6,00 екв.) при кімнатній температурі. Суміш перемішували протягом 1,5 годин. Реакцію контролювали за допомогою ТСХ (PE/ $EtOAc$  10:1). Залишок підлукували до рН 8 насиченим  $NaHCO_3$  (водн.). Суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (100 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах, отримуючи 4-[2-(дифторметил) фенокси] -5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо [3,4-*d*] піримідин (329 мг, 49,75 %) у вигляді твердої речовини брудно-білого кольору.

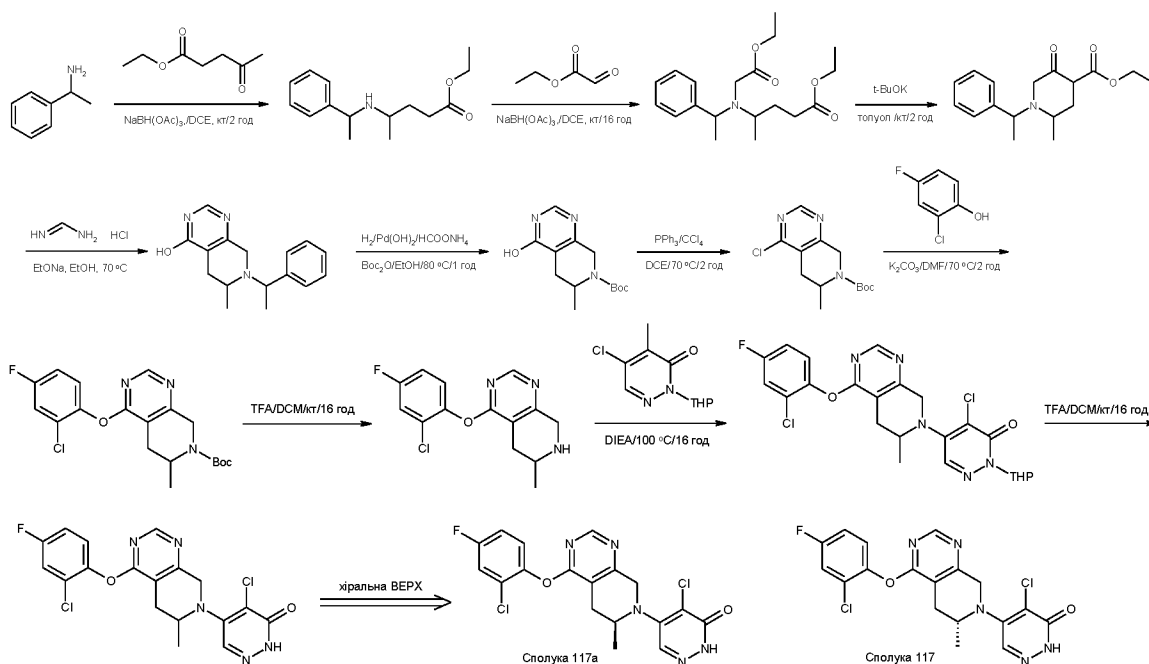
4-Хлор-5-[4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (328 мг, 1,183 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (169,05 мг, 0,679 ммоль, 1,00 екв.) додавали DIEA (175,43 мг, 1,357 ммоль, 2,00 екв.) порціями при 70 °С. Суміш перемішували протягом 2 годин при 70 °С. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах: колонка, силікагель С18; рухома фаза, MeOH у воді, градієнт від 10 % до 50 % за 10 хв; детектор, УФ 254 нм. з отриманням 4-хлор-5-[4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (328 мг, 56,60 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-[2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (328 мг, 0,670 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях при кімнатній температурі трифтороцтову кислоту (3 мл). Суміш упарювали у вакуумі. Продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ з отриманням 4-хлор-5-[4 [2-(дифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (256,4 мг, 94,38 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

Приклад 6. Синтез Сполуки 117 і 117а



етил 4-[(1-фенілетил)аміно]пентаноат

До перемішаного розчину 1-фенілетан-1-аміну (25 г, 206,300 ммоль, 1 екв.) і етил 4-оксопентаноату (29,74 г, 206,300 ммоль, 1 екв.) в ДХЕ (400 мл, 5052,598 ммоль, 24,49 екв.) додавали  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (65,59 г, 309,449 ммоль, 1,5 екв.) порціями при 25 °С в атмосфері азоту. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Реакцію гасили додаванням  $\text{H}_2\text{O}$  (400 мл) при 0 °С. Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали насиченим розчином  $\text{NaCl}$  (водн.) (3 × 200 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт використовували в подальшій стадії.

етил 4-[(2-етокси-2-оксоетил)(1-фенілетил)аміно]пентаноат

До перемішаного розчину етил 4-[(1-фенілетил)аміно]пентаноату (49 г, 196,508 ммоль, 1 екв.) і етил 2-оксоацетату (40,12 г, 392,990 ммоль, 2,00 екв.) в ДХЕ (500 мл, 6315,747 ммоль, 32,14 екв.) додавали  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (62,47 г, 294,762 ммоль, 1,5 екв.) порціями при 25 °С в атмосфері азоту. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Реакцію гасили додаванням  $\text{H}_2\text{O}$  (400 мл) при 0 °С. Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали насиченим розчином  $\text{NaCl}$  (водн.) (3 × 200 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт етил 4-[(2-етокси-2-оксоетил)(1-фенілетил)аміно]пентаноат (57 г, 86,47 %) використовували в подальшій стадії.

етил 2-метил-5-оксо-1-(1-фенілетил)піперидин-4-карбоксилат

До розчину етил 4-[(2-етокси-2-оксоетил)(1-фенілетил)аміно]пентаноату (57 г, 169,924 ммоль, 1 екв.) в толуені (500 мл, 4699,452 ммоль, 27,66 екв.) додавали трет- $\text{BuOK}$  (47,67 г, 424,810 ммоль, 2,5 екв.) частинами при 0 °С. Суміш перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюювали  $\text{PE/EA}$  (від 50/1 до 10/1), з отриманням етил 2-метил-5-оксо-1-(1-фенілетил)піперидин-4-карбоксилату (29 г, 58,98 %) у вигляді жовтої олії.

7-(1-циклогексилетил)-6-метил-декагідропіrido[3,4-d]піримідин-4-ол

До розчину етил 2-метил-5-оксо-1-(1-фенілетил)піперидин-4-карбоксилату (10 г, 34,557 ммоль, 1 екв.) і гідрохлориду метанімідаміду (4,17 г, 51,836 ммоль, 1,50 екв.) в  $\text{EtOH}$  (100 мл, 1721,353 ммоль, 49,81 екв.) додавали  $\text{EtONa}$  (5,88 г, 86,393 ммоль, 2,50 екв.) частинами при 25 °С. Суміш перемішували при 90 °С протягом 2 годин. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю ДХМ/ $\text{MeOH}$  (від 20/1 до 10/1) з отриманням 7-(1-циклогексилетил)-6-метилдекагідропіrido[3,4-d]піримідин-4-олу (3,4 г, 34,96 %) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

Трет-бутил 4-гідрокси-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До розчину 6-метил-7-(1-фенілетил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-4-олу (3,5 г, 12,994 ммоль, 1 екв.),  $\text{HCOONH}_4$  (4,10 г, 65,022 ммоль, 5,00 екв.) і  $\text{Boc}_2\text{O}$  (8,51 г, 38,983 ммоль, 3 екв.) в  $\text{EtOH}$  (50 мл, 860,677 ммоль, 66,23 екв.) додавали  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (0,36 г, 2,599 ммоль, 0,2 екв.) в атмосфері азоту. Суміш гідрували при 70 °С протягом 2 годин в атмосфері водню з використанням балону з воднем, фільтрували через шар целіту і упарювали за зниженого тиску.

3 отриманням трет-бутил 4-гідрокси-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (1,8 г, 52,21 %) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

Трет-бутил 4-хлор-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

5 До розчину трет-бутил 4-гідрокси-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (1,8 г, 6,784 ммоль, 1 екв.) і  $\text{Prh}_3$  (3,56 г, 13,569 ммоль, 2 екв.) в ДХЕ (20 мл, 252,630 ммоль, 37,24 екв.) додавали  $\text{SnCl}_4$  (3,13 г, 20,353 ммоль, 3 екв.) при 25 °С. Суміш перемішували при 70 °С протягом 3 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи РЕ/ЕА (від 10/1 до 1/1) з отриманням трет-бутил 4-хлор-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату

10 (1,1 г, 57,14 %) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.  
Трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

15 До розчину трет-бутил 4-хлор-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (1,1 г, 3,877 ммоль, 1 екв.) і 2-хлор-4-фторфенолу (0,85 г, 5,800 ммоль, 1,50 екв.) в ДМФА (15 мл, 193,826 ммоль, 50,00 екв.) додавали  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,07 г, 7,753 ммоль, 2 екв.) при 25 °С. Суміш перемішували при 70 °С протягом 1 години. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи РЕ/ЕА (від 10/1 до 5/1), з отриманням трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (1,2 г, 78,60 %) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

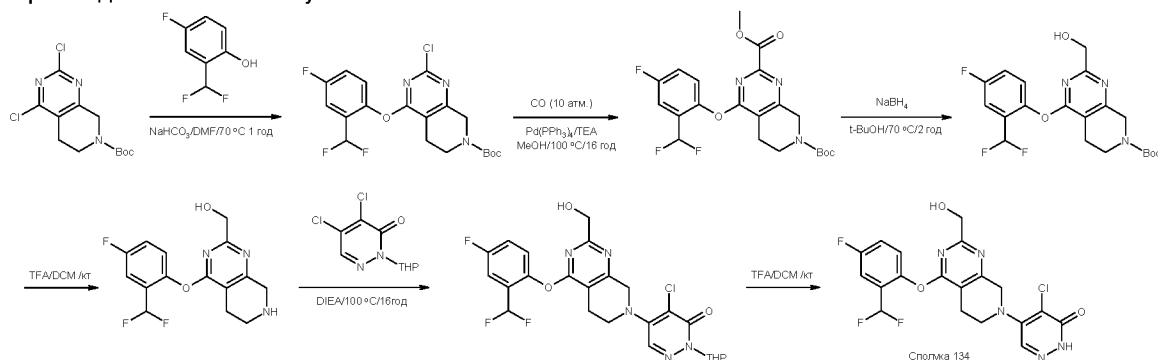
20 4-Хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

25 Суміш 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (800 мг, 2,724 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (678,42 мг, 2,724 ммоль, 1,00 екв.) в DIEA (704,01 мг, 5,447 ммоль, 2 екв.) перемішували протягом 16 годин при 100 °С в атмосфері азоту. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (РЕ/ЕА 1/1), з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (530 мг, 38,43 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

30 4-хлор-5-[(6*R*)-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

35 До розчину 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (530 мг, 1,047 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (20 мл, 314,601 ммоль, 300,57 екв.) додавали ТФУ (1193,47 мг, 10,467 ммоль, 10 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 2 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (600 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30 \* 150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хв; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з отриманням рацемату (200 мг). Залишок (200 мг) очищали за допомогою хіральної препаративної ВЕРХ при таких умовах: Колонка: CHIRALPAK IE, 2\*25 см, 5 мкм; Рухома фаза А: МТВЕ (0,1 % FA) -ВЕРХ, рухома фаза В: ІПС - ВЕРХ; Швидкість потоку: 18 мл/хв; Градієнт: від 20 В до 20 В за 15 хв; 220/254 нм. Хоча два ізомери були розділені цим методом, абсолютна орієнтація не була визначена. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[(6*S*)-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (60,9 мг, 13,78 %) отримували через 9,688 хв у вигляді білої твердої речовини. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[(6*R*)-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-6-метил-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (61,5 мг, 13,92 %) отримували через 11.813 хв у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 7. Синтез Сполуки 134



Трет-бутил 2-хлор-4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину 2-(дифторметил)-4-фторфенолу (5,33 г, 32,879 ммоль, 2,00 екв.) і трет-бутил 2,4-дихлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (5 г, 16,438 ммоль, 1 екв.) в ДМФА (30 мл) додавали NaHCO<sub>3</sub> (4,14 г, 49,282 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при 70 °С протягом 0,5 години. Суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 70 % В-95 % В градієнт за 100 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 92 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 2-хлор-4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (2,100 г) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

7-трет-Бутил 2-метил 4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2,7-дикарбоксилат

До розчину трет-бутил 2-хлор-4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (400 мг, 0,931 ммоль, 1 екв.) і ТЕА (188,34 мг, 1,861 ммоль, 2 екв.) в MeOH (15 мл, 370,484 ммоль, 398,10 екв.) додавали Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (107,54 мг, 0,093 ммоль, 0,1 екв.) в резервуарі високого тиску. Суміш продували азотом протягом 1 години, а потім підвищували тиск до 10 атм монооксидом вуглецю при 100 °С протягом 16 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і фільтрували для видалення нерозчинних твердих речовин. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C<sub>18</sub>, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 35 % В-65 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 62 % В і упарювали за зниженого тиску, з отриманням 7-трет-бутил 2-метил 4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2,7-дикарбоксилату (100 мг, 23,70 %) у вигляді безбарвної олії.

Трет-бутил 4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину 7-трет-бутил 2-метил-4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2,7-дикарбоксилату (100 мг, 0,221 ммоль, 1 екв.) в трет-БуОН (6 мл, 63,139 ммоль, 286,29 екв.) додавали NaBH<sub>4</sub> (16,69 мг, 0,441 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при 70 °С протягом 3 годин. До суміші додавали воду (3 мл). Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 45 % В-80 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 74 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (35 мг, 37,30 %) у вигляді безбарвної олії.

[4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл] метанол

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (35 мг) в ДХМ (6 мг) додавали ТФУ (1 мг) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 25 % В-55 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 41 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням [4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл]метанолу (20 мг) у вигляді безбарвної олії.

4-хлор-5-[4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо [3,4-d] піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

В круглодонну колбу на 25 мл додавали [4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл]метанол (20 мг, 0,061 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (15,31 мг, 0,061 ммоль, 1 екв.) при кімнатній температурі. До суміші додавали DIEA (15,89 мг, 0,123 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Суміш перемішували при 90 °С протягом 2 годин. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 10 мМ

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 35 % В-70 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 65 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-хлор-5-[4-[2-

(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-

5 (оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (30 мг, 90,71 %) у вигляді безбарвної олії.

4-Хлор-5-[4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-

*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-

(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-

10 ону (30 мг) в ДХМ (5 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Розчин перемішували

при кімнатній температурі протягом 2 годин. Суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий

продукт (30 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge

Rper OBD C18, колонка 30 × 5 мм; рухома фаза А: не визначена, рухома фаза В: не

визначена; швидкість потоку: 60 мл/хв; Градієнт: від 20 % В до 40 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,22

15 хв) з отриманням 4-хлор-5-[4-[2-(дифторметил)-4-фторфенокси]-2-(гідроксиметил)-5Н, 6Н, 7Н,

8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (8,7 мг) у вигляді білої твердої

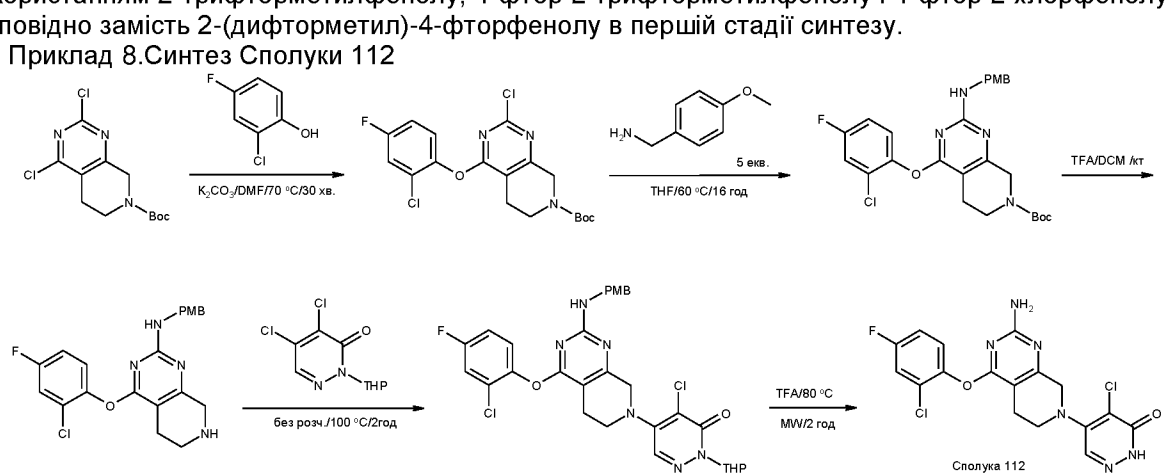
речовини.

Сполуки 128, 125, 114 були отримані способами і за схемою, описаними в цьому прикладі, з

використанням 2-трифторметилфенолу, 4-фтор-2-трифторметилфенолу і 4-фтор-2-хлорфенолу

20 відповідно замість 2-(дифторметил)-4-фторфенолу в першій стадії синтезу.

Приклад 8. Синтез Сполуки 112



Трет-бутил 2-хлор-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-

25 карбоксилат

До перемішаної суміші трет-бутил 2,4-дихлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*] піримідин-7-

карбоксилату (800 мг, 2,630 ммоль, 1 екв.) і 2-хлор-4-фторфенолу (578,16 мг, 3,945 ммоль, 1,50

екв.) в ДМФА (15 мл) додавали  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (726,99 мг, 5,260 ммоль, 2,00 екв.) порціями при кімнатній

температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 0,5 години при 70 °С в

атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до

кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш

екстрагували  $\text{EtOAc}$  (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (2 ×

100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого

тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи  $\text{PE/EtOAc}$  (від

30/1 до 10/1), з отриманням трет-бутил 2-хлор-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-

піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (1 г, 91,78 %) у вигляді жовтої олії.

Трет-Бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[(4-метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-

піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаної суміші трет-бутил 2-хлор-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-

піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (700 мг, 1,690 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (30 мл) додавали 1-(4-

метоксифеніл)метанамін (1159,02 мг, 8,449 ммоль, 5,00 екв.) частинами при кімнатній

температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 16 годин при 60 °С в

атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до

кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш

екстрагували  $\text{EtOAc}$  (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (2 ×

100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого

тиску. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах (колонка,

силікагель С18; рухома фаза, ацетонітрил у воді, градієнт від 60 % до 95 % за 20 хв; детектор,

УФ 220 нм) з отриманням трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[(4-

метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (350 мг, 40,22 %) у вигляді жовтої олії.

4-(2-хлор-4-фторфенокси)-N-[(4-метоксифеніл)метил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-2-амін

5 До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[[4-метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (350 мг, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка XBridge Shield RP18 OBD, 5 мкм, 19\*150 мм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 25 мл/хв.; Градієнт: від 2 % В до 32 % В за 1 хв; 220/254 нм; Rt: 7,08 хв) з отриманням 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-N-[(4-метоксифеніл)метил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-2-аміну (260 мг) у вигляді жовтої олії.

4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[[4-метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

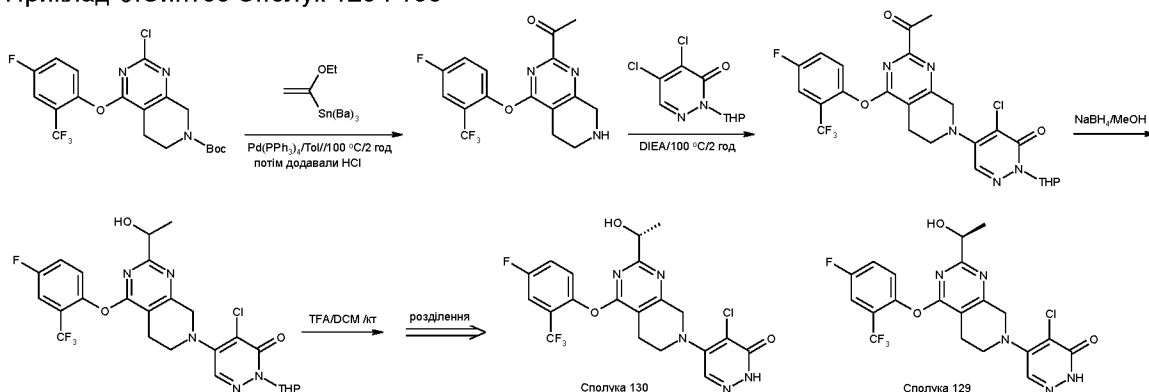
20 В круглодонну колбу на 50 мл додавали 4-(2-хлор-4-фторфенокси)-N-[(4-метоксифеніл)метил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-2-амін (260 мг, 0,627 ммоль, 1 екв.), 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (156,11 мг, 0,627 ммоль, 1,00 екв.) і DIEA (242,99 мг, 1,880 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 90 °С в атмосфері азоту. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах (колонка, силікагель С18; рухома фаза, ацетонітрил у воді, градієнт від 50 % до 85 % за 25 хв; детектор, УФ 220 нм) з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[[4-метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (350 мг, 89,00 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

30 5-[2-аміно-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл]-4-хлор-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-(2-хлор-4-фторфенокси)-2-[[4-метоксифеніл)метил]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (200 мг) в ТФУ (8 мл, 107,704 ммоль, 328,23 екв.). Кінцеву реакційну суміш опромінювали мікрохвильовим випромінюванням протягом 2 годин при 80 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш екстрагували ДХМ (2 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 25 % В до 40 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,35 хв) з отриманням 5-[2-аміно-4-(2-хлор-4-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл]-4-хлор-2,3-дигідропіридазин-3-ону (52,4 мг) у вигляді жовтої твердої речовини.

45 Сполуки 113, 116 і 102 були отримані способами і за схемою, описаними в цьому прикладі, з використанням 2-хлорфенолу, 4-фтор-2-трифторметилфенолу, 2-трифторфенолу відповідно замість 2-хлор-4-фторфенолу в першій стадії синтезу.

Приклад 9. Синтез Спелук 129 і 130



1-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл]етан-1-он

До суміші трет-бутил 2-хлор-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (600 мг, 1,340 ммоль, 1 екв.) і трибутил (1-етоксиетеніл)станану (967,80 мг, 2,680 ммоль, 2,00 екв.) в толуені (10 мл) додавали Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (77,41 мг, 0,067 ммоль, 0,05 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували 4 години при 110 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Це призвело до отримання трет-бутил 2-(1-етоксиетеніл)-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (700 мг, 108,06 %) у вигляді жовтої олії. Сиру отриману суміш використовували в подальшій стадії безпосередньо без додаткового очищення.

До перемішаного розчину трет-бутил 2-(1-етоксиетеніл)-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (1 г, 2,068 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (5 мл) додавали ТФУ (3,33 мл, 29,239 ммоль, 21,70 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш/залишок підлучували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 43 % В-55 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 50 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 1-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл]етан-1-ону (750 мг, 102,06 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

5-[2-Ацетил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

В круглодонну колбу на 50 мл додавали 1-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-іл]етан-1-он (750 мг, 2,111 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (525,81 мг, 2,111 ммоль, 1,00 екв.) при кімнатній температурі. До вищезазначеної суміші додавали DIEA (818,47 мг, 6,333 ммоль, 3,00 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 100 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 60 % В-85 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 80 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 5-[2-ацетил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (230 мг, 19,18 %) у вигляді світло-жовтої олії.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-(1-гідроксиетил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 5-[2-ацетил-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (230 мг, 0,405 ммоль, 1 екв.) в MeOH (10 мл) додавали NaBH<sub>4</sub> (30,64 мг, 0,810 ммоль, 2,00 екв.) порціями при 0 °С в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 1/1) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-(1-гідроксиетил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (120 мг, 51,99 %) у вигляді світло-жовтої олії.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-[(1S)-1-гідроксиетил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он і 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-[(1R)-1-гідроксиетил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

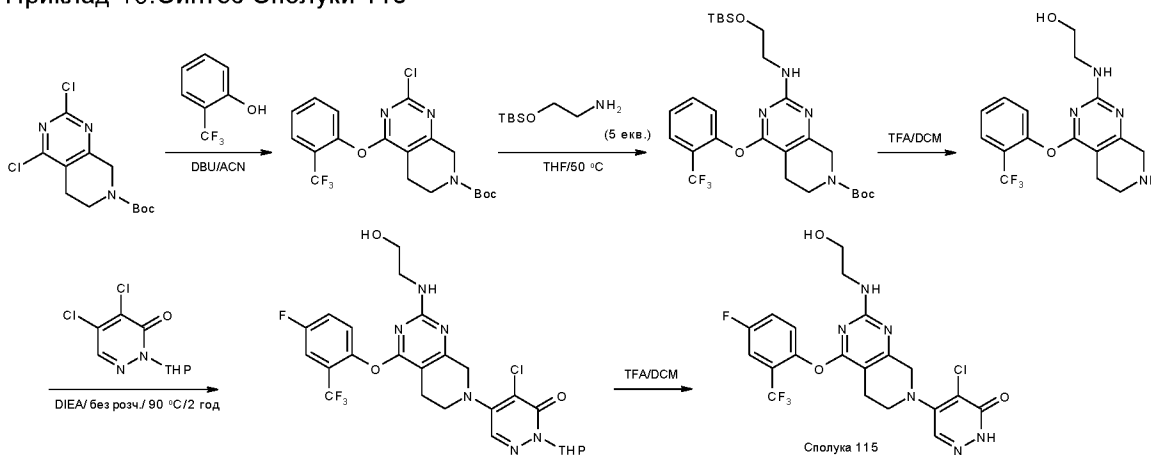
До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-(1-гідроксиетил)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (120 мг, 0,211 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (5 мл) додавали ТФУ (2,00 мл, 17,541 ммоль, 127,89 екв.) по краплях при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Залишок підлучували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-80 % В градієнт за 25 хв;

Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 55 % В і концентрували за зниженого тиску. Сирий продукт (50 мг) очищали за допомогою хіральної препаративної ВЕРХ в таких умовах (Колонка: CHIRALPAK ІЕ, 2\*25 см, 5 мкм; рухома фаза А: Гек (0,1 % FA) - ВЕРХ, рухома фаза В: EtOH --ВЕРХ; швидкість потоку: 16 мл/хв; градієнт: від 30 до 30 В за 33 хв; 220/254 нм; RT1:26,219; RT2:29,589). Хоча два ізомери були розділені цим методом, абсолютна орієнтація не була визначена. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-[(1S)-1-гідроксиетил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (27,1 мг) отримували через 29,589 хв у вигляді брудно-білої твердої речовини. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-[(1R)-1-гідроксиетил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (22,6 мг) отримували через 26,219 хв у вигляді брудно-білої твердої речовини.

Сполуку 119 отримували способами і за схемою, описаними в цьому Прикладі, з використанням трет-бутил 2-хлор-4-[4-фтор-2-хлорфенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату в якості вихідного матеріалу.

Сполуки 122 і 123 були отримані методами і за схемою, описаними в цьому Прикладі, з використанням трет-бутил 2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату в якості вихідної речовини. Знову ж таки, абсолютна орієнтація цих розділених ізомерів не була визначена, і позначення як (S) або (R) було довільним.

#### Приклад 10. Синтез Сполуки 115



трет-Бутил 2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 2,4-дихлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (2 г, 6,58 ммоль, 1 екв.) і 2-(трифторметил)фенолу (1,6 г, 9,86 ммоль, 1,5 екв.) в ацетонітрилі (20 мл) додавали DBU (2,0 г, 13,15 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 10:1) з отриманням трет-бутил-2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (700 мг, 24,77 %) у вигляді безбарвної олії.

трет-бутил 2-([2-[(трет-бутилдиметилсиліл)окси]етил]аміно)-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До розчину трет-бутил 2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,163 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (15 мл) додавали (2-аміноетокси) трет-бутилдиметилсилан (1019,89 мг, 5,816 ммоль, 5,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 16 годин при 50 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 3/1) з отриманням трет-бутил 2-([2-[(трет-бутилдиметилсиліл)окси]етил]аміно)-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (440 мг, 66,51 %) у вигляді світло-жовтої олії.

2-([4-[2(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-2-іл]аміно)етан-1-ол

До перемішаного розчину трет-бутил 2-([2-[(трет-бутилдиметилсиліл)окси]етил]аміно)-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (440 мг, 0,774 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали ТФУ (3 мл, 40,389 ммоль, 52,20 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах: колонка, силікагель С18; рухома фаза, АСН у воді, градієнт від 40 % до 60 % за 15 хв; детектор, УФ 254

нм, з отриманням 2-([4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-2-іл]аміно)етан-1-олу (220 мг) у вигляді світло-жовтої олії.

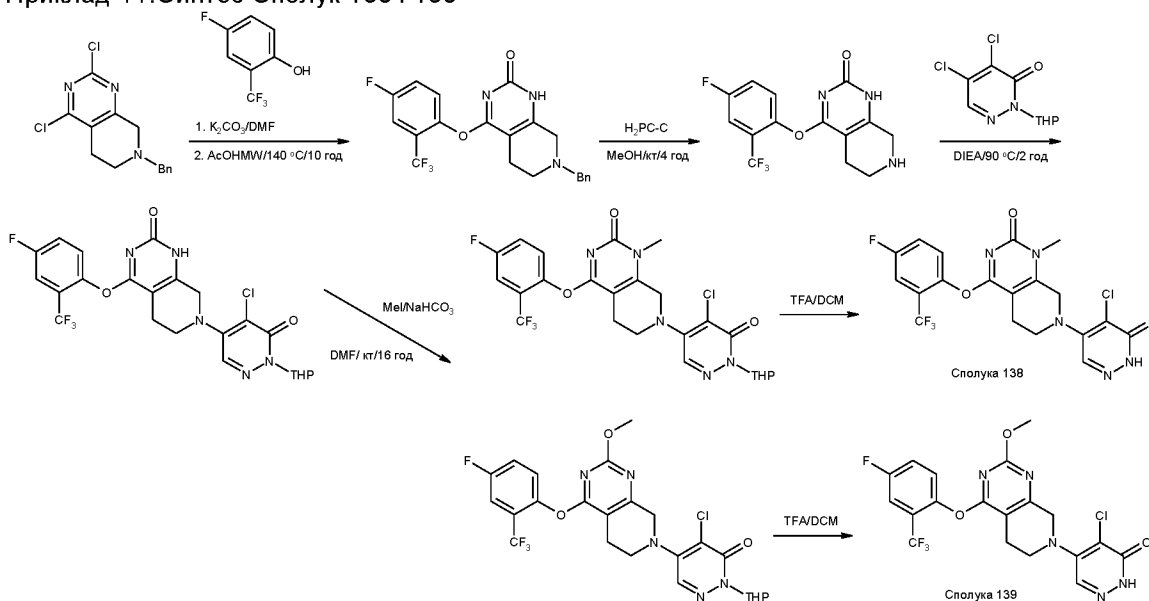
4-Хлор-5-[2-[(2-гідроксиетил)аміно]-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

5 В круглодонну колбу на 50 мл додавали 2-([4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-2-іл]аміно)етан-1-ол (220 мг, 0,621 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (154,66 мг, 0,621 ммоль, 1,00 екв.) при кімнатній температурі. До вищезазначеної суміші додавали DIEA (240,74 мг, 1,863 ммоль, 3,00 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 2 год. при 100 °С. За реакцією сліdkували за допомогою РХМС Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: АСН; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 45 % В-60 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 55 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-хлор-5-[2-[(2-гідроксиетил)аміно]-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (210 мг, 59,66 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

4-хлор-5-[2-[(2-гідроксиетил)аміно]-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

20 До перемішаного розчину 4-хлор-5-[2-[(2-гідроксиетил)аміно]-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (200 мг, 0,353 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (5 мл) додавали ТФУ (2 мл) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30×150мм 5 мкм; рухома фаза А: не визначена, рухома фаза В: не визначена; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: 25 % В до 50 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,67 хв) з отриманням 4-хлор-5-[2-[(2-гідроксиетил)аміно]-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (106,3 мг) у вигляді білої твердої речовини.

30 Приклад 11. Синтез Сполуки 138 і 139



7-бензил-2-хлор-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин

35 До перемішаного розчину 4-фтор-2-(трифторметил)фенолу (1469,32 мг, 8,158 ммоль, 1,20 екв.) і 7-бензил-2,4-дихлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d] піримідину (2000 мг, 6,799 ммоль, 1 екв.) в ДМФА (20 мл) додавали K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1879,20 мг, 13,597 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при 70 °С протягом 0,5 години. Суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ ТФУ); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 70 % В-95 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 95 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 7-бензил-2-хлор-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідину (2331 мг, 78,31 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

7-Бензил-4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-он

Розчин 7-бензил-2-хлор-4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідину (2 г, 4,568 ммоль, 1 екв.) в НАс (10 мл, 174,515 ммоль, 38,20 екв.) і Н<sub>2</sub>О (1 мл, 55,508 ммоль, 12,15 екв.) перемішували протягом 10 годин при 140 °С в атмосфері N<sub>2</sub>. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (РЕ/ЕА 1/1), з отриманням 7-бензил-4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-ону (530 мг, 27,67 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-он

До розчину 7-бензил-4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-ону (530 мг, 1,264 ммоль, 1 екв.) в MeOH (10 мл, 246,989 ммоль, 195,44 екв.) додавали Pd/C (268,98 мг, 2,528 ммоль, 2 екв.) в атмосфері азоту. Суміш гідрували при кімнатній температурі протягом 4 годин в атмосфері водню з використанням балону з воднем, фільтрували через шар целіту і упарювали за зниженого тиску. З отриманням 4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-ону (430 мг, 103,34 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

Суміш 4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-2-ону (430 мг, 1,306 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (357,84 мг, 1,437 ммоль, 1,1 екв.) в DIEA (337,58 мг, 2,612 ммоль, 2,00 екв.) перемішували протягом 2 годин при 100 °С в атмосфері N<sub>2</sub>. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (РЕ/ЕА 1/1) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (210 мг, 29,67 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1-метил-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он і 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-метокси-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (90 мг, 0,166 ммоль, 1 екв.) і NaHCO<sub>3</sub> (27,90 мг, 0,332 ммоль, 2 екв.) в ДМФА (10 мл, 129,218 ммоль, 778,02 екв.) по краплях додавали CH<sub>3</sub>I (47,15 мг, 0,332 ммоль, 2,00 екв.) при 0 °С в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 25 °С протягом 16 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (РЕ/ЕА 0/1) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1-метил-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (60 мг, 64,99 %) і 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-метокси-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (15 мг) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1-метил-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

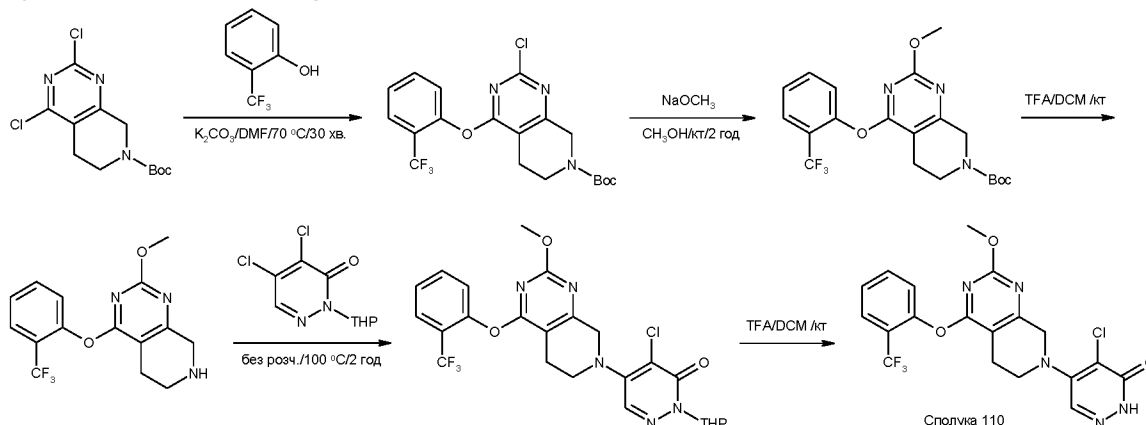
До розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1-метил-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (60 мг, 0,108 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл, 157,300 ммоль, 1457,41 екв.) додавали ТФУ (123,07 мг, 1,079 ммоль, 10 екв.) при 25 °С. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (100 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30\*150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хвилин; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-1-метил-2-оксо-1Н, 2Н, 5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (29,3 мг, 57,54 %) у вигляді білої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-метокси-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До розчину 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2(трифторметил)фенокси]-2-метокси-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (15 мг, 0,027 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (5 мл, 78,650 ммоль, 2914,83 екв.) додавали ТФУ (30,77 мг, 0,270 ммоль, 10 екв.) при 25 °С. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (20 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30\*150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хвилин; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з

отриманням 4-хлор-5-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-2-метокси-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (7,5 мг, 58,91 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 12. Синтез Сполуки 110



5

Трет-Бутил 2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 2,4-дихлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (2 г, 6,58 ммоль, 1 екв.) і 2-(трифторметил)фенолу (1,6 г, 9,86 ммоль, 1,5 екв.) в ацетонітрилі (20 мл) додавали DBU (2,0 г, 13,15 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 10:1) з отриманням трет-бутил-2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (700 мг, 24,77 %) у вигляді безбарвної олії.

15

Трет-Бутил 2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До розчину трет-бутил 2-хлор-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (1 г, 2,327 ммоль, 1 екв.) в MeOH (20 мл, 493,978 ммоль, 212,32 екв.) додавали NaOMe (0,25 г, 0,005 ммоль, 2 екв.) при 25° С. Суміш перемішували при 25 °С протягом 4 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюювали PE/EA (від 10/1 до 1/1), з отриманням трет-бутил 2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (100 мг, 10,10 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

20

2-Метокси-4-[2-(трифторметил) фенокси] -5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо [3,4-d] піримідин

25

До розчину трет-бутил 2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (100 мг, 0,235 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали ТФУ (268,03 мг, 2,351 ммоль, 10 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 4 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (150 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30\*150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хв; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з отриманням 2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідину (80 мг, 104,62 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

30

4-Хлор-5-[2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

35

Розчин 2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідину (80 мг, 0,246 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (61,26 мг, 0,246 ммоль, 1 екв.) в DIEA (63,57 мг, 0,492 ммоль, 2,00 екв.) перемішували протягом 2 годин при 100 °С в атмосфері азоту. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюювали PE/EA (від 5/1 до 1/1) з отриманням 4-хлор-5-[2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (120 мг, 90,71 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

40

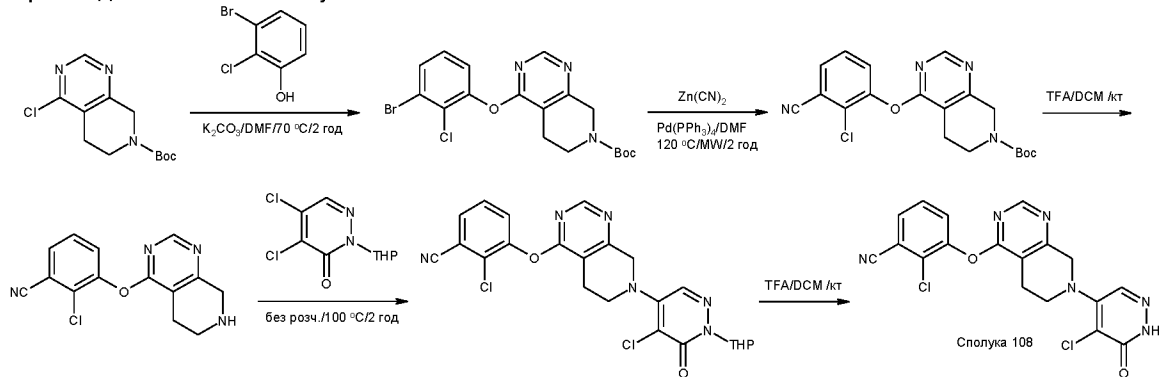
4-Хлор-5-[2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин -3-он

45

До розчину 4-хлор-5-[2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (120 мг, 0,223 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (5 мл, 78,650 ммоль, 352,56 екв.) додавали ТФУ (254,36 мг, 2,231 ммоль, 10,00 екв.) при 25 °С.

Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (150 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, колонка 30\*150 мм, 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 40 % В за 7 хвилин; 220 нм; Rt: 6,63 хв) з отриманням 4-хлор-5-[2-метокси-4-[2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (24,1 мг, 23,81 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 13. Синтез Сполуки 108



Трет-Бутил 4-(3-бром-2-хлорфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил-4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,854 ммоль, 1 екв.) і 3-бром-2-хлорфенолу (461,46 мг, 2,224 ммоль, 1,20 екв.) в ДМФА (10 мл) додавали K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (512,38 мг, 3,707 ммоль, 2 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 70 °С. Суміш очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах: Колонка: (spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; рухома фаза А: вода (5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: від 20 % В до 60 % В за 55 хв; 254 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 40 % В і упарювали за зниженого тиску. Це призвело до отримання трет-бутил-4-(3-бром-2-хлорфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (300 мг, 36,72 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

Трет-Бутил 4-(2-хлор-3-ціанофенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-(3-бром-2-хлорфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (450 мг, 1,021 ммоль, 1 екв.) і дикарбонітрилу цинку (143,87 мг, 1,225 ммоль, 1,20 екв.) в ДМФА (5 мл) додавали Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (117,99 мг, 0,102 ммоль, 0,1 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 120 °С в атмосфері азоту. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах: Колонка: spherical C18, 20-40 мкм, 180 г; Рухома фаза А: вода (5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: від 10 % В до 60 % В за 55 хвилин; 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 40 % В і упарювали за зниженого тиску. Це призвело до трет-бутил 4-(2-хлор-3-ціанофенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (280 мг, 70,89 %) у вигляді твердої речовини світло-жовтого кольору.

2-Хлор-3-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-4-ілокси]бензонітрил

До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-хлор-3-ціанофенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (100 мг, 0,259 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (3 мл) додавали ТФУ (1 мл). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі в атмосфері повітря. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 7 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Суміш очищали зворотною флеш-хроматографією в таких умовах: Колонка: spherical C18, 20-40 мкм, 180 г; Рухома фаза А: вода (5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: від 30 % В до 60 % В за 30 хв; 254 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 45 % В і упарювали за зниженого тиску. Це призвело до 2-хлор-3-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-4-ілокси] бензонітрилу (60 мг, 80,95 %) у вигляді світло-жовтої олії.

2-Хлор-3-([7-[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-4-іл]окси)бензонітрил

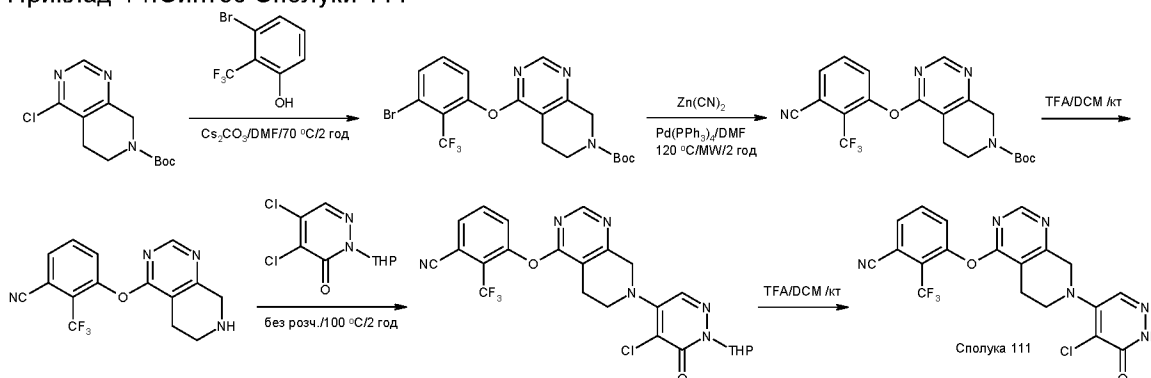
До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-хлор-3-ціанофенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (60 мг, 0,155 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (38,63 мг, 0,155 ммоль, 1,00 екв.) в DIEA (40,09 мг, 0,310 ммоль, 2 екв.). Отриману суміш перемішували протягом декількох годин при 100 °С в атмосфері повітря. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 1:1) з отриманням 2-хлор-3-([7-

[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл]оксибензонітрилу (50 мг, 64,56 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

2-Хлор-3-[[7-(5-хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл]окси]бензонітрил

5 До перемішаного розчину 2-хлор-3-[[7-(5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл]окси]бензонітрилу (50 мг, 0,100 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (3 мл) додавали ТФУ (1 мл). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 7 насиченим  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (водн.). Сирий продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 42 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,58 хв) з отриманням 2-хлор-3-[[7-(5-хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл]окси]бензонітрилу (14,5 мг, 34,88 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

15 Приклад 14. Синтез Сполуки 111



Трет-Бутил 4-[3-бром-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

20 До перемішаної суміші трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (180 мг, 0,667 ммоль, 1 екв.) і 3-бром-2-(трифторметил)фенолу (241,25 мг, 1,001 ммоль, 1,50 екв.) в ДМФА (10 мл) додавали  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (434,86 мг, 1,335 ммоль, 2,00 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 0,5 години при 70 °С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонуть до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску.

25 Отриману суміш екстрагували  $\text{EtOAc}$  (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (2 × 100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах (колонка, силікагель С18; рухома фаза, ацетонітрил у воді, градієнт від 40 % до 85 % за 30 хв; детектор, УФ 220 нм) з отриманням трет-бутил 4-[3-бром-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (150 мг, 47,39 %) у вигляді жовтої олії.

Трет-Бутил 4-[3-ціано-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилат

35 До перемішаної суміші трет-бутил 4-[3-бром-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (150 мг, 0,316 ммоль, 1 екв.) і  $\text{Zn}(\text{CN})_2$  (111,43 мг, 0,949 ммоль, 3,00 екв.) в ДМФА (8 мл) додавали  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (36,55 мг, 0,032 ммоль, 0,1 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Кінцеву реакційну суміш опромінювали мікрохвильовим випромінюванням протягом 3 годин при 150 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах (колонка, силікагель С18; рухома фаза, ацетонітрил у воді, градієнт від 40 % до 95 % за 30 хв; детектор, УФ 220 нм) з отриманням трет-бутил 4-[3-ціано-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (70 мг, 52,65 %) у вигляді жовтої олії.

3-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-ілокси]-2-(трифторметил)бензонітрил

45 До перемішаного розчину трет-бутил 4-[3-ціано-2-(трифторметил)фенокси]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (70 мг) в ДХМ (10 мл) по краплях додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (водн.). Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над

безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою зворотної флеш-хроматографії в таких умовах (колонка, силікагель С18; рухома фаза, ацетонітрил у воді, градієнт від 30 % до 60 % за 20 хв; детектор, УФ 220 нм) з отриманням 3-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-ілокси]-2-(трифторметил)бензонітрилу (40 мг) у вигляді жовтої олії.

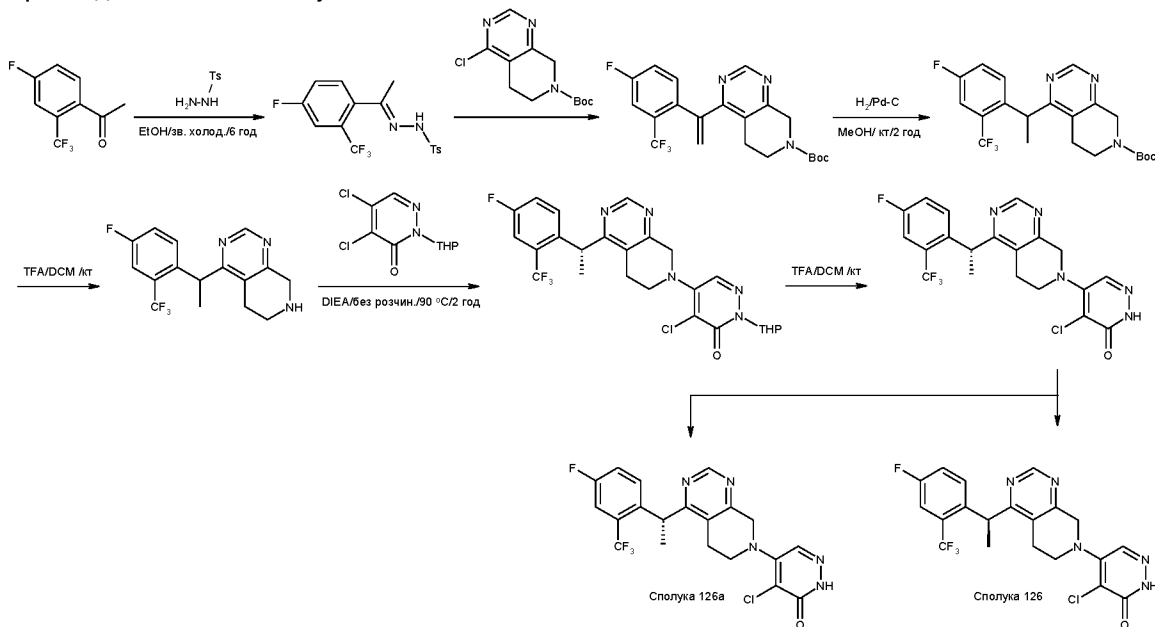
3-([7-(5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл)окси)-2-(трифторметил)бензонітрил

В круглодонну колбу на 25 мл додавали 3-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-ілокси]-2-(трифторметил)бензонітрил (40 мг, 0,125 ммоль, 1 л. екв.), 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (62,22 мг, 0,250 ммоль, 2,00 екв.) і DIEA (48,42 мг, 0,375 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 16 годин при 90 °С в атмосфері азоту. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc=5/1) з отриманням 3-([7-(5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл)окси)-2-(трифторметил)бензонітрилу (50 мг, 75,12 %) у вигляді жовтої олії.

3-([7-(5-Хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл)окси)-2-(трифторметил)бензонітрил

До перемішваного розчину 3-([7-(5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл)окси)-2-(трифторметил)бензонітрилу (50 мг) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (водн.). Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18, колонка 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 25 % В до 45 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,07 хв) з отриманням 3-([7-(5-хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-4-іл)окси)-2-(трифторметил)бензонітрилу (10,8 мг) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 15. Синтез Сполук 126 і 126а



N-([1E)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етиліден]-4-метилбензен-1-сульфогідразид

До перемішваного розчину 1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етан-1-ону (2 г, 9,702 ммоль, 1 екв.) в EtOH (40 мл) додавали 4-метилбензен-1-сульфогідразиду (1,81 г, 9,719 ммоль, 1,00 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 6 годин при 90 °С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ АсОН); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 45 % В-70 % В градієнт

за 20 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 60 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням N-[(1E)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етиліден]-4-метилбензен-1-сульфоногідрозиду. (2,5 г, 68,83 %) у вигляді білої твердої речовини.

5 Трет-Бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етеніл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішуваної суміші трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (750 мг, 2,781 ммоль, 1 екв.) і N-[(1E)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етиліден]-4-метилбензен-1-сульфоногідрозиду (2081,80 мг, 5,561 ммоль, 2,00 екв.) в 1,4-діоксані (20 мл) додавали Pd(ацетонітрил)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (72,14 мг, 0,278 ммоль, 0,10 екв.), Dppf (307,18 мг, 0,556 ммоль, 0,2 екв.) і t-BuOLi (489,71 мг, 6,117 ммоль, 2,20 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Кінцеву реакційну суміш опромінювали мікрохвильовим випромінюванням протягом 2 годин при 100 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш фільтрували, осад на фільтрі промивали EtOAc (2 × 50 мл). Фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ АсОН); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 50 % В-90 % В градієнт за 30 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 85 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етеніл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (800 мг, 67,95 %) у вигляді коричневої олії.

Трет-Бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До розчину трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етеніл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (150 мг) в 30 мл MeOH додавали Pd/C (10 %, 30 мг) в атмосфері азоту в круглодонній колбі на 100 мл. Суміш гідрували при кімнатній температурі протягом 4 годин в атмосфері водню з використанням балону з воднем, фільтрували через шар целюліти і упарювали за зниженого тиску. Це призвело до трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (150 мг) у вигляді жовтої олії.

4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин

До перемішуваного розчину трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (150 мг) в ДХМ (10 мл) по краплях додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Реакційну суміш екстрагували ДХМ (3×50 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 30 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ АсОН); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-58 % В градієнт за 15 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 53 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідину (100 мг) у вигляді жовтої олії.

45 4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

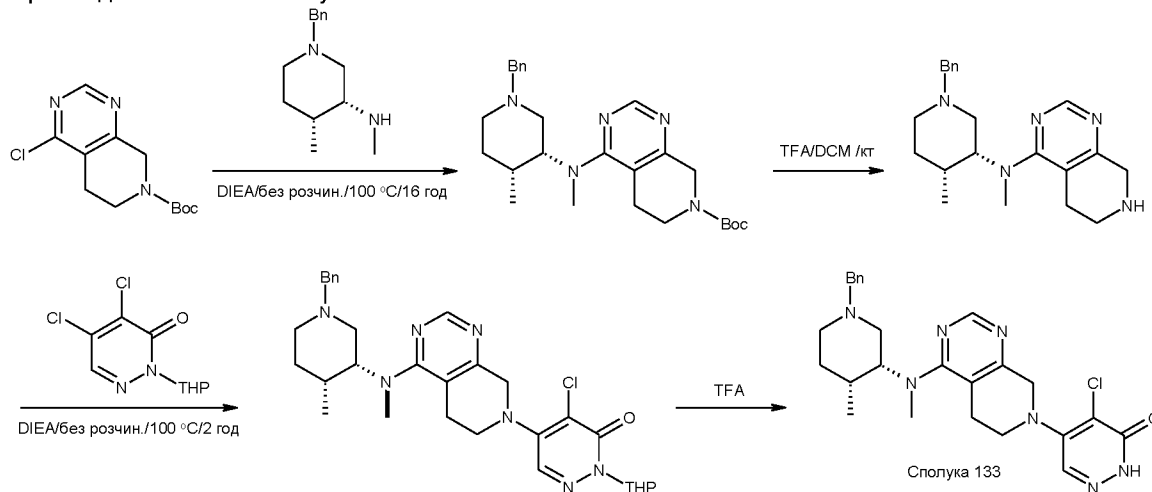
В круглодонну колбу на 50 мл додавали 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин (100 мг., 0,307 ммоль, 1 екв.), 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (91,88 мг, 0,369 ммоль, 1,20 екв.) і DIEA (119,19 мг, 0,922 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 90 °С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ АсОН); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-60 % В градієнт за 15 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 53 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (120 мг, 72,57 %) у вигляді жовтої олії.

60 4-Хлор-5-[4 -[(1S)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он і 4-хлор-5-[4-[(1R)-1-[4-фтор-2-

(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (200 мг) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 4 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (водн.). Отриману суміш екстрагували ДХМ (3 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою хіральної препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep Phenyl OBD Column 19×150 мм 5 мкм 13 нм; рухома фаза А: рухома фаза В: швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 20 % В до 37 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,97 хв). Хоча два ізомери були розділені цим методом, абсолютна орієнтація не була визначена. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[4-[(1S)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (11,8 мг) отримували через 1,819 хв у вигляді брудно-білої твердої речовини. Сполуку, позначену як 4-хлор-5-[4-[(1R)-1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он (13,5 мг) отримували через 2,470 хв у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 16. Синтез Сполуки 133



трет-Бутил 4-[метил[(3R, 4R)-4-метилпіперидин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

В круглодонну колбу на 25 мл додавали (3R, 4R)-1-бензил-N, 4-диметилпіперидин-3-амін (2,43 г, 0,011 ммоль, 1,50 екв.) і трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат (2 г, 0,007 ммоль, 1 екв.) при кімнатній температурі. До суміші додавали DIEA (1,92 г, 0,015 ммоль, 2,00 екв.) при кімнатній температурі. Суміш перемішували при 100 °С протягом 2 годин. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 1:1), з отриманням трет-бутил 4-[метил[(3R, 4R)-4-метилпіперидин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (670 мг, 25,00 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

(3R, 4R)-1-Бензил-N, 4-диметил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-4-іл]піперидин-3-амін

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[(3R, 4R)-1-бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (413 мг, 0,914 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях при 0 °С трифтороцтову кислоту (3 мл, 0,026 ммоль, 6,00 екв.). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Розчин упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (362 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Shield RP18 OBD Column, 5 мкм, 19\*150 мм; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; градієнт: від 30 % В до 80 % В за 25 хв; 220 нм; Rt: 21,65 хв) з отриманням (3R, 4R)-1-бензил-N, 4-диметил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-4-іл]піперидин-3-аміну (250 мг, 77,77 %) у вигляді червоної олії.

5-(4-[(3R, 4R)-1-Бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл)-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

В круглодонну колбу на 25 мл додавали (3R, 4R)-1-бензил-N, 4-диметил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-4-іл]піперидин-3-амін (263 мг, 0,748 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-

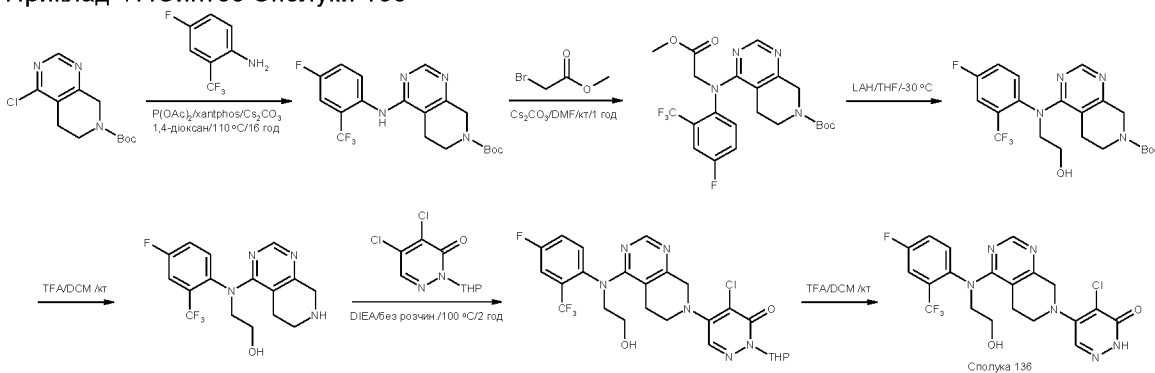
2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (186,38 мг, 0,748 ммоль, 1,00 екв.) при кімнатній температурі. До суміші додавали DIEA (193,41 мг, 1,261 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Суміш перемішували протягом 2 годин при 100 °С. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 45 % В-95 % В градієнт за 30 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 85 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 5-(4-[[[3R, 4R)-1-бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (245 мг, 58,04 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

5-(4-[[[3R, 4R)-1-Бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-4-хлор-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішуваної розчину 5-(4-[[[3R, 4R)-1-бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-4-хлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (88 мг, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) додавали трифтороцтову кислоту. (3 мл, 0,026 ммоль, 6,00 екв.) по краплях при 0 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Розчин упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ TFA); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 33 % В-95 % В градієнт за 30 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 90 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 5-(4-[[[3R, 4R)-1-бензил-4-метилпіперидин-3-іл](метил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-4-хлор-2,3-дигідропіридазин-3-ону (33,5 мг, 44,74 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

Сполуку 133а отримували способами і за схемою, описаними в цьому прикладі, з використанням (3S, 4S)-1-бензил-N, 4-диметилпіперидин-3-аміну замість (3R, 4R)-1-бензил-N, 4-диметилпіперидин-3-аміну.

#### Приклад 17. Синтез Сполуки 136



Трет-Бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

Суміш 4-фтор-2-(трифторметил)аніліну (6,64 г, 37,074 ммоль, 2 екв.), Трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (5 г, 18,537 ммоль, 1 екв.), Pd(АсО)<sub>2</sub> (0,83 г, 3,707 ммоль, 0,2 екв.), XantPhos (4,29 г, 7,415 ммоль, 0,4 екв.) і Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12,08 г, 37,074 ммоль, 2 екв.) в 1,4-діоксані (80 мл) перемішували при 110 °С протягом 16 годин. Реакційну суміш фільтрували і фільтрат упарювали з отриманням сирого продукту, який очищали колонковою хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю РЕ:ЕА (від 20:1 до 1:2) з отриманням трет-бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (5,6 г, 73,26 %) у вигляді білої твердої речовини.

Трет-Бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-метокси-2-оксоетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішуваної суміші трет-бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (3 г, 7,275 ммоль, 1 екв.) і метил 2-бромацетату (2,23 г, 14,578 ммоль, 2,00 екв.) в ДМФА (30 мл) додавали Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,74 г, 14,548 ммоль, 2,00 екв.) порціями при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш екстрагували EtOAc (3 × 400 мл). Об'єднані органічні шари промивали розсолем (2 × 200 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ ТФУ); Рухома фаза

В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 55 % В-85 % В градієнт за 30 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 79 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-метокси-2-оксоетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 14,19 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

Трет-Бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-метокси-2-оксоетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,032 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (50 мл) додавали LiAlH<sub>4</sub> (78,34 мг, 2,064 ммоль, 2,00 екв.) порціями при -30 °С в атмосфері азоту. Реакційну суміш перемішували протягом 16 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Реакцію гасили додаванням води (1 мл) при -30 °С. Тверді речовини, що випали в осад, збирали фільтрацією і промивали MeOH (3×30 мл). Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (РЕ/ЕА=1/1) з отриманням трет-бутил 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (100 мг, 21,23 %) у вигляді жовтої олії.

4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (150 мг) в ДХМ (10 мл) по краплях додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Реакційну суміш екстрагували ДХМ (3×50 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 30 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-58 % В градієнт за 15 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 53 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етил]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідину (100 мг) у вигляді жовтої олії.

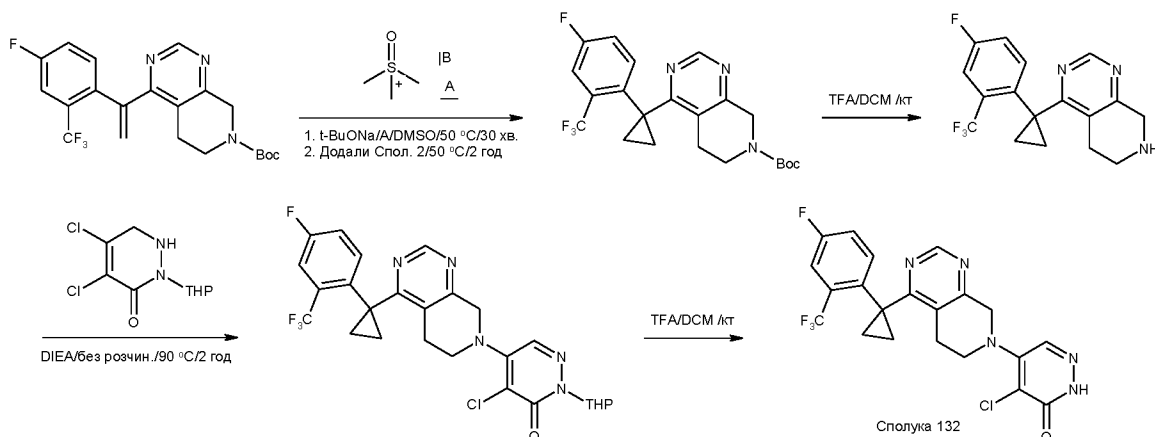
4-Хлор-5-(4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

В круглодонну колбу на 50 мл додавали 2-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-4-іл)аміно]етан-1-ол (40 мг, 0,112 ммоль, 1 екв.), 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (55,92 мг, 0,224 ммоль, 2,00 екв.) і DIEA (43,53 мг, 0,337 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 90 °С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-60 % В градієнт за 15 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 55 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-хлор-5-(4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (50 мг, 78,28 %) у вигляді жовтої олії.

4-Хлор-5-(4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-(4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (50 мг) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш екстрагували EtOAc (2 × 50 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18 Column 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: не визначена, рухома фаза В: не визначена; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: 30 % В до 45 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,6 хв) з отриманням 4-хлор-5-(4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](2-гідроксиетил)аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (6,2 мг) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 18. Синтез Сполуки 132



### Трет-Бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину  $t\text{-BuONa}$  (226,97 мг, 2,362 ммоль, 2,00 екв.) в ДМСО (20 мл) додавали  $\text{Me}_3\text{SiI}$  (472,57 мг, 2,362 ммоль, 2,00 екв.) порціями при 40  $^\circ\text{C}$  в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 0,5 години при 40  $^\circ\text{C}$  в атмосфері азоту. Потім трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]етеніл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат (500 мг, 1,181 ммоль, 1 екв.) в ДМСО (5 мл) додавали по краплях при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш екстрагували  $\text{EtOAc}$  (3  $\times$  100 мл). Об'єднані органічні шари промивали розсолон (2  $\times$  100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 55 % В-80 % В градієнт за 25 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 73 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (240 мг, 46,46 %) у вигляді жовтої олії.

### 4-[1-[4-Фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (240 мг, 0,549 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (10 мл) по краплях додавали ТФУ (1 мл, 13,463 ммоль, 24,54 екв.) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (водн.). Отриману суміш екстрагували  $\text{EtOAc}$  (2  $\times$  100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1  $\times$  100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ  $\text{AcOH}$ ); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 33 % В-45 % В градієнт за 20 хв; Детектор: 254 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 40 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідину (150 мг, 81,05 %) у вигляді жовтої олії.

### 4-Хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

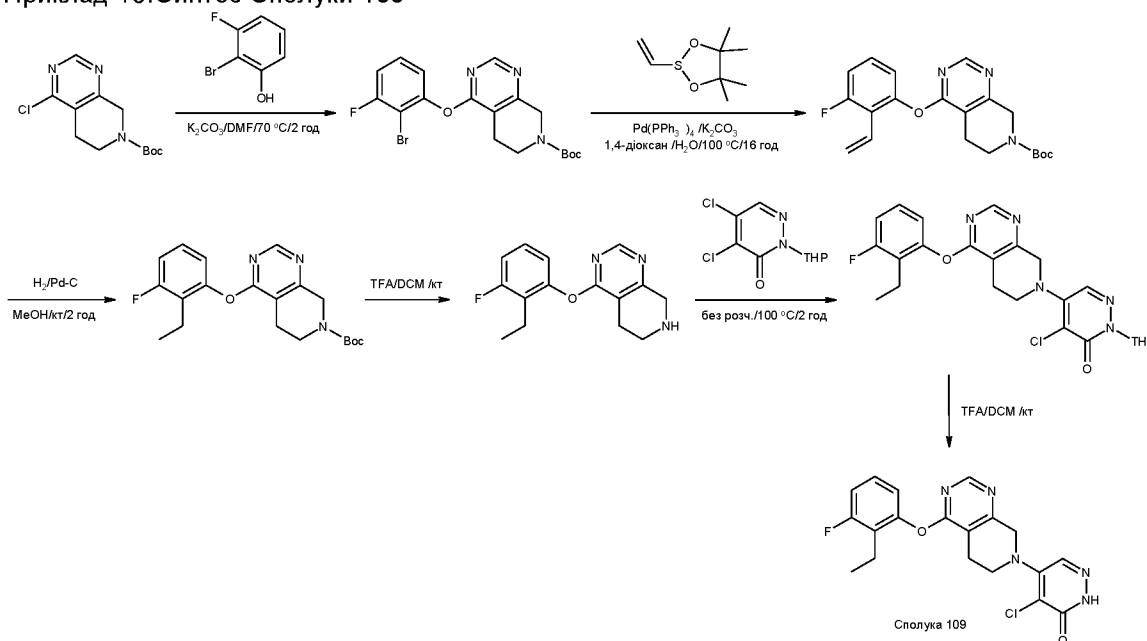
В круглодонну колбу на 50 мл додавали 4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піrido[3,4-d]піримідин (150 мг, 0,445 ммоль, 1 екв.), 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-1,2,3,6-тетрагідропіридазин-3-он (134,00 мг, 0,534 ммоль, 1,20 екв.) і DIEA (172,42 мг, 1,334 ммоль, 3,00 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 90  $^\circ\text{C}$  в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % - 5 % В, 10 хв, 40 % В-60 % В градієнт за 15 хв; Детектор: 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 54 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням

4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (200 мг, 81,78 %) у вигляді жовтої олії.

4-Хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

- 5 До перемішаного розчину 4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (200 мг) в ДХМ (10 мл) додавали по краплях ТФУ (2 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімн. темп. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш екстрагували EtOAc (2 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18 Column 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: не визначена, рухома фаза В: не визначена; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: 30 % В до 55 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,232 хв) з отриманням 4-хлор-5-(4-[1-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]циклопропіл]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (39,2 мг) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

#### Приклад 19. Синтез Сполуки 109



- 20 Трет-Бутил 4-(2-бром-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат  
 До перемішаного розчину трет-бутил 4-хлор-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,854 ммоль, 1 екв.) і 2-бром-3-фторфенолу (424,87 мг, 2,224 ммоль, 1,20 екв.) в ДМФА (10 мл) додавали K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (512,38 мг, 3,707 ммоль, 2 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 0,5 години при 70 °С. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Реакцію гасили водою при кімнатній температурі. Отриману суміш екстрагували EtOAc (2 × 100 мл). Об'єднані органічні шари промивали розсолем (2 × 100 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (5:1), з отриманням трет-бутил 4-(2-бром-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 63,58 %) у вигляді білої твердої речовини.

- Трет-Бутил 4-(2-етеніл-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат  
 До розчину трет-бутил 4-(2-бром-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,178 ммоль, 1 екв.) і пентаметил-1,3,2-діоксаборолану (334,72 мг, 2,357 ммоль, 2,00 екв.) в H<sub>2</sub>O (2 мл) і 1,4-діоксані (16 мл) додавали K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (325,75 мг, 2,357 ммоль, 2 екв.) і Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (68,09 мг, 0,059 ммоль, 0,05 екв.). Після перемішування протягом ночі при 90 °С в атмосфері азоту отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (5:1) з отриманням трет-бутил 4-(2-етеніл-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (250 мг, 57,12 %) у вигляді жовтої олії.

- 40 Трет-Бутил 4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-етеніл-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (250 мг, 0,673 ммоль, 1 екв.) в MeOH (10 мл) додавали Pd/C (100 мг, 0,940 ммоль, 1,40 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі в атмосфері водню. Отриману суміш фільтрували, осад на фільтрі промивали MeOH (2 × 10 мл). Фільтрат упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Це призвело до трет-бутил 4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (210 мг, 0,08 %) у вигляді чорної олії.

4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин

До перемішаного розчину трет-бутил 4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-карбоксилату (210 мг, 0,562 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (3 мл) додавали ТФУ (1 мл). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі в атмосфері повітря. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Суміш очищали зворотною флеш-хроматографією в таких умовах: Колонка: spherical C18, 20-40 мкм, 180 г; Рухома фаза А: вода (5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: від 25 % В до 60 % В за 40 хв; 254 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 40 % В і упарювали за зниженого тиску. Це призвело до 4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (120 мг, 78,07 %) у вигляді світло-жовтої олії.

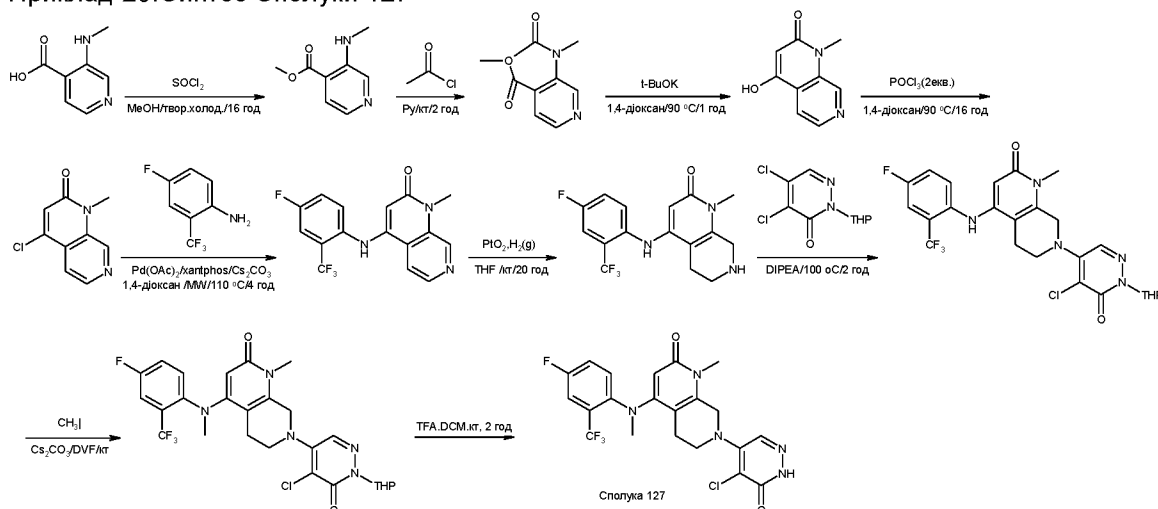
4-Хлор-5-[4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідину (120 мг, 0,439 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (109,37 мг, 0,439 ммоль, 1,00 екв.) в DIEA (113,49 мг, 0,878 ммоль, 2 екв.) Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 100 °С в атмосфері повітря. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (PE/EtOAc 1:1), з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 46,87 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

4-Хлор-5-[4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-[4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 0,206 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (3 мл) додавали ТФУ (1 мл). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 7 насиченим NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (водн.). Сирий продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep OBD C18 Column 30×150 мм 5 мкм; рухома фаза А: вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), Рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 30 % В до 50 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,27 хв) з отриманням 4-хлор-5-[4-(2-етил-3-фторфенокси)-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-*d*]піримідин-7-іл]-2,3-дигідропіридазин-3-ону (41,6 мг, 50,31 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 20. Синтез Сполуки 127



Метил 3-(метиламіно)піридин-4-карбоксилат

До перемішаного розчину 3-(метиламіно)піридин-4-карбонової кислоти (11 г, 72,296 ммоль, 1 екв.) в MeOH (500 мл, 12349,455 ммоль, 170,82 екв.) додавали SOCl<sub>2</sub> (43,01 г, 361,478 ммоль, 5 екв.) по краплях при 0 °С. Отриману суміш перемішували 30 годин при 70 °С. Реакцію

відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок розчиняли в етилацетаті (50 мл). Суміш підлужують до рН 8 насиченим  $\text{NaHCO}_3$  (водн.). Отриману суміш екстрагували  $\text{EtOAc}$  (2 × 20 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 30 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску, щоб отримати метил 3-(метиламіно)піридин-4-карбоксилат (9 г, сирий) у вигляді жовтої твердої речовини.

Метил 3-(N-метилацетамідо)піридин-4-карбоксилат

До перемішаного розчину метил 3-(метиламіно)піридин-4-карбоксилату (9 г, 54,158 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (100 мл) додавали піридин (21,42 г, 270,791 ммоль, 5 екв.) і ацетилхлорид. (6,38 г, 81,237 ммоль, 1,5 екв.) по краплях при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Розчин підлужували до рН 8 насиченим  $\text{NaHCO}_3$  (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (Колонка: C18 колонка 330 г; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; градієнт: 10 % В до 30 % В за 25 хвилин; 254/220 нм) з отриманням метил 3-(N-метилацетамідо)піридин-4-карбоксилату (8 г, 70,94 %) у вигляді коричневої рідини.

4-гідрокси-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-он

До перемішаного розчину метил 3-(N-метилацетамідо)піридин-4-карбоксилату (6 г, 28,816 ммоль, 1 екв.) в сухому 1,4-діоксані (100 мл) додавали  $t\text{-BuOK}$  (6,47 г, 57,632 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 90 °С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю ДХМ/MeOH (10:1) з отриманням 4-гідрокси-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (4,5 г, 88,64 %) у вигляді помаранчевої твердої речовини.

4-Хлор-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-он

До перемішаного розчину 4-гідрокси-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (4,5 г, 25,543 ммоль, 1 екв.) в сухому 1,4-діоксані (100 мл) по краплях додавали  $\text{POCl}_3$  (3,92 г, 25,543 ммоль, 1 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 16 годин при 90 °С. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю ДХМ/MeOH (10:1) з отриманням 4-хлор-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (2 г, 40,23 %) у вигляді червоної твердої речовини.

4-[[4-Фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-он

До перемішаного розчину 4-хлор-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (0,8 г, 4,111 ммоль, 1 екв.) в сухому 1,4-діоксані (15 мл) додавали  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2,68 г, 8,221 ммоль, 2 екв.), 4-фтор-2-(трифторметил)анілін (1,47 г, 8,221 ммоль, 2,00 екв.), XantPhos (0,95 г, 1,644 ммоль, 0,4 екв.) і  $\text{Pd}(\text{AcO})_2$  (0,18 г, 0,822 ммоль, 0,2 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Кінцеву реакційну суміш опромінювали мікрохвильовим випромінюванням протягом 4 годин при 110 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш екстрагували  $\text{EtOAc}$  (3×50 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (1 × 100 мл), сушили над безводним  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: C18 колонка 330 г; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{AcOH}$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 50 мл/хв; градієнт: 20 % В до 40 % В за 40 хв; 254/220 нм) з отриманням 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (1,1 г, 79,34 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

4-[[4-Фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-он

До перемішаного розчину 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2-дигідро-1,7-нафтиридин-2-ону (1 г, 2,965 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (20 мл) додавали  $\text{PtO}_2$  (67,33 мг, 0,296 ммоль, 0,10 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 16 годин при кімнатній температурі в атмосфері водню. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш фільтрували, осад на фільтрі промивали  $\text{EtOAc}$  (3×20 мл). Фільтрат упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: C18 колонка 330 г; рухома фаза А: вода (10 мМ  $\text{AcOH}$ ), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; градієнт: від 5 % В до 20 % В за 40 хвилин; 254/220 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 16 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 4-[[4-фтор-

2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (750 мг, 74,11 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини.

7-[5-Хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-он

5 До перемішуваної суміші 4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (750 мг, 2,197 ммоль, 1 екв.) і 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (1,09 г, 4,395 ммоль, 2 екв.) додавали DIPEA (568,00 мг, 4,395 ммоль, 2 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 100 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Залишок розчиняли в ДМФА (10 мл). Розчин очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (Колонка: С18 колонка 330 г; рухома фаза А: вода (10 мМ FА), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; градієнт: 30 % В до 50 % В за 40 хв; 254/220 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 44 % В і упарювали за зниженого тиску, з отриманням 7-[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (1 г, 82,15 %) у вигляді жовтої олії.

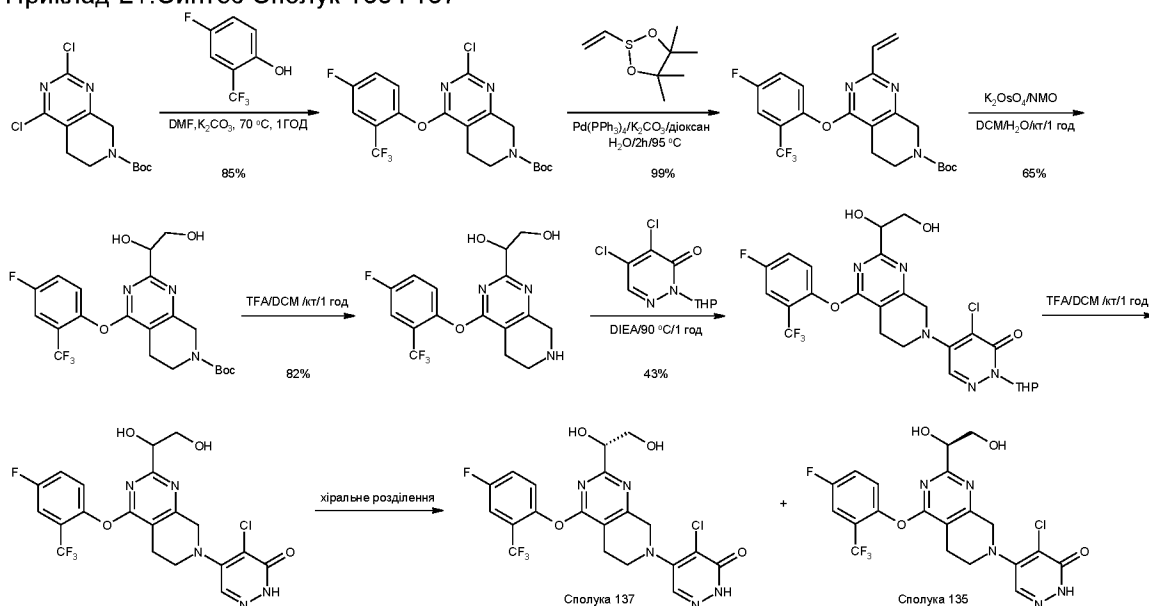
7-[5-Хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](метил)аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-он

20 До перемішуваного розчину 7-[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (800 мг, 1,444 ммоль, 1 екв.) в ДМФА (20 мл) додавали Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,94 г, 2,888 ммоль, 2 екв.) і MeI (614,96 мг, 4,333 ммоль, 3 екв.) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 16 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміш очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: С18 колонка 120 г; рухома фаза А: вода (10 мМ АсОН), рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: 40 % В до 60 % В за 40 хв; 254/220 нм). Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 49 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням 7-[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](метил)аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (80 мг, 9,75 %) у вигляді жовтої олії.

7-(5-Хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл)-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](метил)аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-он

30 До перемішуваного розчину 7-[5-хлор-1-(оксан-2-іл)-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл]-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](метил)аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (80 мг, 0,141 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4,5 мл) по краплях додавали ТФУ (0,5 мл, 6,732 ммоль, 31,07 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Розчин очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі з отриманням 7-(5-хлор-6-оксо-1,6-дигідропіридазин-4-іл)-4-[[4-фтор-2-(трифторметил)феніл](метил)аміно]-1-метил-1,2,5,6,7,8-гексагідро-1,7-нафтиридин-2-ону (40 мг, 58,69 %) у вигляді білої твердої речовини.

40 Приклад 21. Синтез Сполук 135 і 137



Трет-бутил 2-хлор-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-карбоксилат.

До розчину трет-бутил 2,4-дихлор-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (5 г, 16,44 ммоль) в ДМФА (50 мл) додавали 4-фтор-2-(трифторметил)фенол (4,44 г, 24,66 ммоль) і додавали K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,41 г, 24,66 ммоль) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 70 °С. Після охолодження до кімнатної температури. Виконували фільтрацію, і фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах (Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 330 г; рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 80 мл/хв; Градієнт: 5 % за 10 хвилин, від 35 % В до 45 % В за 10 хвилин; Детектор: 254 нм/220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 44 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 2-хлор-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (6,2 г, 85 %) у вигляді білої твердої речовини.

Трет-бутил 4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-2-вініл-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-карбоксилат.

До розчину трет-бутил 2-хлор-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,12 ммоль) в діоксані (10 мл) додавали 2-етеніл-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан (344 мг, 2,23 ммоль) і H<sub>2</sub>O (0,5 мл, 27,75 ммоль) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (309 мг, 2,23 ммоль) і Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (129 мг, 0,11 ммоль). Після перемішування протягом 2 годин при 95 °С в атмосфері азоту отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ, елюювали 17 % етилацетатом в петролейному етері з отриманням трет-бутил 2-етеніл-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (490 мг, 99 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

Трет-бутил 2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-карбоксилат.

До розчину трет-бутил 2-етеніл-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (400 мг, 0,91 ммоль) в ДХМ (20 мл) додавали 4-гідрокси-4-метилморфолін-4-іум (323 мг, 2,73 ммоль) і K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O (34 мг, 0,091 ммоль) при кімнатній температурі. Після перемішування протягом ще 1 години отриману суміш упарювали за зниженого тиску і залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 45 мл/хв; градієнт: 5 % В за 10 хвилин, від 45 % В до 65 % В за 15 хвилин; детектор: 254 нм і 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 64 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням трет-бутил 2-(1,2-дигідроксиетил)-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (280 мг, 65 %) у вигляді білої твердої речовини.

1-(4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,6,7,8-тетрагідропіrido[3,4-d]піримідин-2-іл)етан-1,2-діол.

До перемішуваного розчину трет-бутил 2-(1,2-дигідроксиетил)-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (280 мг, 0,59 ммоль) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Отриману суміш упарювали у вакуумі. Залишок розчиняли в ДХМ (50 мл) і промивали насиченим водним NaHCO<sub>3</sub> (20 мл). органічний шар відокремлювали і сушили над безводним сульфатом натрію. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску і залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ з 8 % метанолом в дихлорметані з отриманням 1-[4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-2-іл]етан-1,2-діолу (180 мг, 82 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)-2-(тетрагідро-2H-піран-2-іл)піридазин-3(2H)-он.

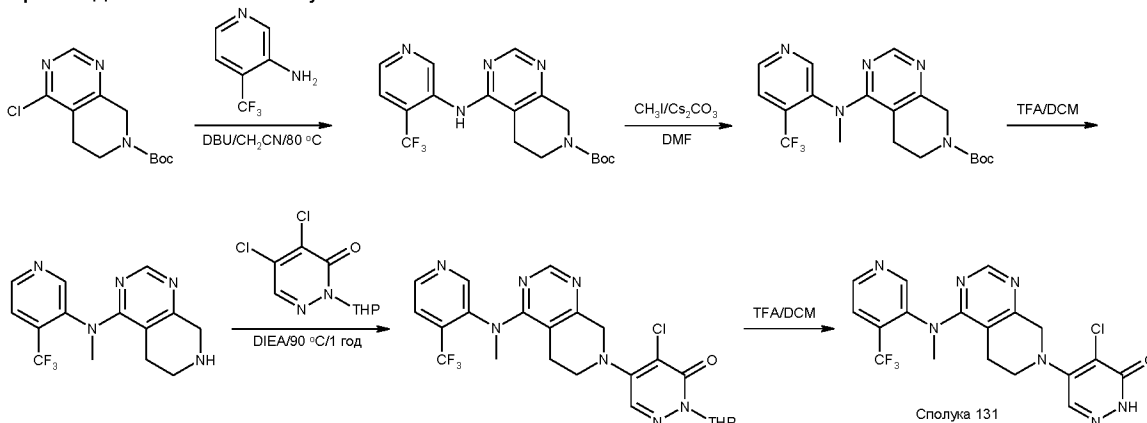
До перемішуваного розчину 2-[5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-4-ілокси]бензальдегіду (180 мг, 0,71 ммоль) в DIEA (0,5 мл) додавали 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (176 мг, 0,71 ммоль) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 90 °С. Після охолодження до температури навколишнього середовища отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ, елюювали 8 % метанолом в дихлорметані з отриманням 4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)-2-(тетрагідро-2H-піран-2-іл)піридазин-3(2H)-ону (140 мг, 43 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

(S)-4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)піридазин-3(2H)-он і (R)-4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-

4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)піридазин-3(2H)-он

До розчину 4-хлор-5-[2-(1,2-дигідроксиетил)-4-[4-фтор-2-(трифторметил)фенокси]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-іл]-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (150 мг, 0,27 ммоль) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою в таких умовах: Колонка: Spherical C18, 20-40 мкм, 120 г; Рухома фаза А: вода (плюс 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); Рухома фаза В: ацетонітрил; Швидкість потоку: 45 мл/хв; Градієнт: 5 % В за 10 хвилин, від 45 % В до 65 % В за 15 хвилин; Детектор: 254 нм і 220 нм. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали при 64 % В і упарювали за зниженого тиску з отриманням рацемічного продукту (130 мг), який розділяли за допомогою препаративної хіральної ВЕРХ в таких умовах: Колонка: XBridge Prep OBD C18 Column 30 × 150 мм., 5 мкм; Рухома фаза А: гексан, рухома фаза В: EtOH; Швидкість потоку: 20 мл/хв; Градієнт: 35 % В за 10 хв; Детектор: 254/220 нм). Хоча два ізомери були розділені цим методом, абсолютна орієнтація не була визначена. Фракції, що містять бажаний продукт, збирали і упарювали за зниженого тиску, щоб отримати продукт: Сполуку, позначену як (S)-4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)піридазин-3(2H)-он: час утримання (4,97 хв) (49,5 мг, 39 %) у вигляді білої твердої речовини і Сполуку, позначену як (R)-4-хлор-5-(2-(1,2-дигідроксиетил)-4-(4-фтор-2-(трифторметил)фенокси)-5,8-дигідропіrido[3,4-d]піримідин-7(6H)-іл)піридазин-3(2H)-он: час утримання (8,05 хв) (45,7 мг, 36 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 22. синтез Сполуки 131



Трет-бутил 4-[[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішуваної суміші трет-бутил 4-хлор-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (500 мг, 1,854 ммоль, 1 екв.) і 4-(трифторметил)піридин-3-аміну (601,03 мг, 3,707 ммоль, 2,0 екв.) в 1,4-діоксані (5 мл) додавали Pd(AcO)<sub>2</sub> (83,24 мг, 0,371 ммоль, 0,2 екв.) і Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1207,95 мг, 3,707 ммоль, 2,0 екв.) і XantPhos (429,04 мг, 0,741 ммоль, 0,4 екв.) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при 110 градусах С в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш фільтрували, осад на фільтрі промивали DCM (3 × 2 мл). Фільтрат упарювали за зниженого тиску. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: C18, 120 г; рухома фаза А: вода/0,05 % NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, рухома фаза В: ACN; швидкість потоку: 45 мл/хв; градієнт: 45 % В до 65 % В за 15 хв; детектор, 254 нм і 220 нм, бажаний продукт збирали при 64 % В) з отриманням трет-бутил 4-[[4(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (600 мг, 81,86 %) у вигляді білої твердої речовини.

Трет-бутил 4-[метил[4(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилат

До перемішуваної суміші трет-бутил 4-[[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5H, 6H, 7H, 8H-піrido[3,4-d]піримідин-7-карбоксилату (1,32 г, 3,339 ммоль, 1 екв.) і Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,18 г, 6,677 ммоль, 2,0 екв.) в ДМФА (10 мл) додавали СН<sub>3</sub>I (0,95 г, 6,677 ммоль, 2,0 екв.) при 0 °С в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Сирий продукт очищали флеш-

хроматографією на оберненій фазі в таких умовах (колонка: C18, 120 г; рухома фаза А: вода/0,05 % NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, рухома фаза В: ACN; швидкість потоку: 45 мл/хв; градієнт: 45 % В до 65 % В за 15 хв; детектор, 254 нм і 220 нм, бажаний продукт збирали при 64 % В) з отриманням трет-бутил 4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (400 мг, 29,26 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

N-метил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-4-іл]-4-(трифторметил)піридин-3-амін

До перемішаного розчину трет-бутил 4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-карбоксилату (220 мг, 0,537 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (ДХМ/MeOH 12:1) з отриманням N-метил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-4-іл]-4-(трифторметил)піридин-3-аміну (130 мг, 78,22 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-хлор-5-(4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

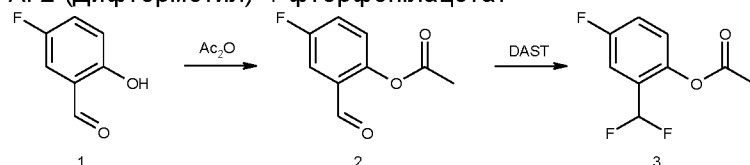
До перемішаного розчину N-метил-N-[5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-4-іл]-4-(трифторметил)піридин-3-аміну (130 мг, 0,420 ммоль, 1 екв.) в DIEA (0,5 мг) додавали 4,5-дихлор-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он (104,69 мг, 0,420 ммоль, 1,0 екв.) при кімнатній температурі. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 90 °С. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Суміші давали охолонути до кімнатної температури. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ТСХ (ДХМ/MeOH 12:1), з отриманням 4-хлор-5-(4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 45,58 %) у вигляді коричневої твердої речовини.

4-хлор-5-(4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-он

До перемішаного розчину 4-хлор-5-(4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2-(оксан-2-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (100 мг, 0,192 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (4 мл) додавали ТФУ (1 мл) при кімнатній температурі... Отриману суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Суміш підлужували до рН 8 насиченим NaHCO<sub>3</sub> (водн.). Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Сирий продукт (100 мг) очищали за допомогою препаративної ВЕРХ в таких умовах (колонка: XBridge Prep Phenyl OBD Column 19×150 мм 5 мкм 13 нм; рухома фаза А: вода, 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, рухома фаза В: ацетонітрил; швидкість потоку: 60 мл/хв; градієнт: від 35 % В до 55 % В за 8 хв; 220 нм; Rt: 7,13 хв) з отриманням 4-хлор-5-(4-[метил[4-(трифторметил)піридин-3-іл]аміно]-5Н, 6Н, 7Н, 8Н-піридо[3,4-д]піримідин-7-іл)-2,3-дигідропіридазин-3-ону (52 мг, 61,99 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 23. Синтез проміжних сполук

А. 2-(Дифторметил)-4-фторфенілацетат



4-Фтор-2-формілфенілацетат

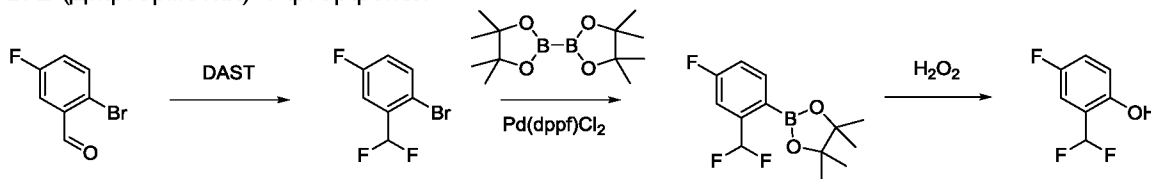
До розчину 5-фтор-2-гідроксибензальдегіду (10 г, 71,371 ммоль, 1 екв.) в піридині (100 мл, 1242,353 ммоль, 17,41 екв.) додавали ацетилацетат (14,57 г, 0,143 ммоль, 2 екв.) при 25 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 30 хв. Отриманий розчин упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи РЕ/ЕА (від 100/1 до 20/1), з отриманням 4-фтор-2-формілфеніл-ацетату (12 г, 92,31 %) у вигляді світло-жовтої олії.

2-(Дифторметил)-4-фторфенілацетат

До розчину 4-фтор-2-формілфенілацетату (12 г, 65,880 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (200 мл, 3146,009 ммоль, 47,75 екв.) додавали DAST (21,24 г, 131,760 ммоль, 2 екв.) при 0 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 4 годин. Отриманий розчин гасили водою (100 мл). Отриману суміш екстрагували ДХМ (100 мл × 2). Об'єднані органічні шари промивали насиченим водн. NaCl. (100 мл × 2) сушать над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за

зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи PE/EA (від 10/1 до 5/1), з отриманням 2-(дифторметил)-4-фторфенілацетату (10 г, 74,35 %) у вигляді світло-жовтої олії.

#### В. 2-(Дифторметил)-4-фторфенол



5

1

#### 1-Бром-2-(дифторметил)-4-фторбензен

До перемішаного розчину 2-бром-5-фторбензальдегіду (10 г, 49,26 ммоль, 1 екв.) в ДХМ (60 мл) додавали DAST (15,9 г, 98,52 ммоль, 2 екв.). Отриману суміш перемішували протягом 2 годин при -10 °С. Реакцію гасили водою при -10 °С. Отриману суміш екстрагували EtOAc (4 × 30 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (2 × 40 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Після фільтрації фільтрат упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи сумішшю PE/EtOAc (6:1), з отриманням 1-бром-2-(дифторметил)-4-фторбензену (8 г, 72,18 %) у вигляді світло-жовтої олії.

10

#### 2-[2-(Дифторметил)-4-фторфеніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан

До розчину 1-бром-2-(дифторметил)-4-фторбензену (31 г, 137,773 ммоль, 1 екв.) і BPD (52,48 г, 206,664 ммоль, 1,50 екв.) в 1,4-діоксані (300 мл, 3541,225 ммоль, 25,70 екв.) додавали AcOK (27,04 г, 275,546 ммоль, 2 екв.) і Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>•CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,63 г, 6,889 ммоль, 0,05 екв.) при 25 °С в атмосфері азоту. Суміш перемішували при 90 °С протягом 2 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок очищали хроматографією на колонці з силікагелем, елюючи PE/EA (10/1), з отриманням 2-[2-(дифторметил)-4-фторфеніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (30 г, 80,03 %) у вигляді світло-жовтої олії. Реакцію відслідковували за допомогою РХМС. Сирий продукт використовували безпосередньо в подальшій стадії.

15

20

#### 2-(Дифторметил)-4-фторфенол

До розчину 2-[2-(дифторметил)-4-фторфеніл]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолану (50 г, 183,776 ммоль, 1 екв.) в MeOH (300 мл, 7409,673 ммоль, 40,32 екв.) і H<sub>2</sub>O (100 мл, 5550,837 ммоль, 30,20 екв.) додавали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) (50 мл, 2146,131 ммоль, 11,68 екв.) по краплях при 0 °С. Розчин перемішували при 25 °С протягом 3 годин. Отриману суміш упарювали за зниженого тиску. Залишок розбавляли EA (500 мл). Органічний шар промивали 3 × 200 мл насиченого розчину NaCl (водн.). Об'єднані органічні шари сушили безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарювали за зниженого тиску з отриманням 2-(дифторметил)-4-фторфенолу (25 г, 83,91 %) у вигляді світло-жовтої олії.

25

30

#### Приклад 24. Аналіз активності TRPC4

ICLN+1694 клітини (HEK-TREx hTRPC4), які експресують TRPC4, отримували наступним чином. Комерційно доступні клітини НекТrex-293 висівали з розрахунку  $0.7 \times 10^6$  клітин/лунку в 1 × 6-лунковий планшет за 24 години до трансфекції, використовуючи 2 мл середовища для росту клітин, що не містить антибіотиків (1x DMEM/високий вміст глюкози (Hyclone # SH30022.02); 10 % фетальна бичача сироватка (Sigma) 2 mM піруват натрію, 10 mM HEPES). Кодуючу послідовність TRPC4 з оптимізованими кодонами людини клонували в pcDNA5/TO (Invitrogen; Cat No. V103320) з використанням гігроміцину як гена стійкості і плазміди (SEQ ID NO: 1), розмноженої з використанням клітин T-Rex-293 (Invitrogen; Cat. No. R71007) відповідно до інструкцій виробника. На 2 день готували 2 мкг плазмідної ДНК плюс 6 мкл реагенту XtremeGENE HP в Opti-mem (загальний об'єм 200 мкл) і інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. Цей розчин плазміди потім акуратно по краплях наносили на кожну лунку, і планшет обережно похитували для змішування комплексу з середовищем протягом приблизно 30 секунд. Трансфіковані клітини інкубували при 37 °С в інкубаторі з 10 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Трансфіковані клітини збирали і переносили в чашки розміром 2 × 150 мм, що містять середовище для росту клітин без антибіотиків, при 37 °С.

35

40

45

На наступний день для створення стабільного пулу ініціювали селекцію шляхом додавання середовища для росту клітин, що містить 150 мкг/мл гігроміцину і 5 мкг/мл бластицидину, і давали клітинам можливість рости. Середовище із селекційним агентом міняли кожні 1-2 дні в міру необхідності для видалення мертвих клітин. Через 7 днів концентрація гігроміцину знизилася до 75 мкг/мл, і ріст клітин продовжився.

50

Окремі клони відбирали наступним чином. Стабільний пул розбавляли до 10 клітин/мл і висівали (100 мкл/лунку) в 24 × 96-лункові планшети (~ 1 клітка/лунку) і давали можливість рости протягом 7 днів в середовищі для росту клітин. Додавали свіже середовище (100 мкл) і

55

клітинам давали можливість рости протягом ще 1-2 тижнів, а потім зберігали замороженими або відразу використовували.

Сполуку готували або поставляли у вигляді 10 мМ вихідного розчину, як правило, з використанням ДМСО в якості несучого середовища. Криві доза-відповідь по 10 точкам були побудовані з використанням акустичного дозатора Echo-550. Планшети з джерелами сполуки були виготовлені шляхом серійного розведення вихідних матеріалів сполук для створення 10 мМ, 1 мМ і 0,1 мМ розчинів в ДМСО в Echo-сертифікованих планшетах LDV. Потім Echo послідовно наносив 100 % вихідні розчини ДМСО у вихідні доза-відповідні планшети для створення схеми 4-кратного розведення. 100 % ДМСО додавали в планшети з нанесенням плям на дозу, щоб довести кінцевий об'єм до 5 мкл. Потім 300 мкл вихідного планшета доза-відповідь вносили в планшети для попередньої інкубації і аналізу стимуляції. Потім в планшети додавали 50 мкл буфера для попередньої інкубації і 100 мкл буфера для стимуляції, що призводило до кінцевого діапазону концентрацій в тесті аналізу від 30 до 0,0001 мкМ з кінцевою концентрацією ДМСО 0,3 %.

ICLN-1694 клітини (HEK-TREx hTRPC4) висівали на 384-лункові чорні покриті рdI мікропланшети і підтримували в середовищі для росту клітин з додаванням 1 мкг/мл тетрацикліну за день до використання для експериментів. Експресію TRPC4 індукували застосуванням тетрацикліну 1 мкг/мл під час посіву. Середовище видаляли з планшетів і 10 мкл 4 мкМ Fluo-4 AM (змішаного з рівним об'ємом Pluronic F-127) в EBSS (NaCl (142 мМ), KCl (5,4 мМ), глюкоза (10 мМ), CaCl<sub>2</sub> (1,8 мМ), MgCl<sub>2</sub> (0,8 мМ), HEPES (10 мМ), pH 7,4) додають до клітин. Клітини інкубували при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60-90 хвилин. Після інкубаційного періоду барвник видаляли і замінювали 10 мкл EBSS. Планшети для клітин, попередньої інкубації і стимуляції завантажували в FLIPR-II і починали аналіз. FLIPR виміряв 10-секундний базовий рівень, а потім додав 10 мкл 2X сполук (або контролів). За змінами флуоресценції стежили протягом додаткових 5 хвилин. Після 5-хвилинної попередньої інкубації в планшет з клітинами додавали 20 мкл 2X енглериу А (з 1X сполукою або контролями). Кінцева концентрація стимуляції енглериу А в аналізі становила 100 нМ. Після додавання енглериу А відстежували зміни флуоресценції протягом додаткових 5 хвилин.

Сполуку модуляції кальцієвої відповіді TRPC4 визначали наступним чином. Після введення Енглериу А флуоресценцію відстежували протягом 5-хвилинного періоду. Максимальна відносна флуоресцентна відповідь (за вирахуванням контрольної відповіді 1 мкМ сполуки внутрішнього контролю, який, як відомо, максимально блокує кальцієву відповідь TRPC4, "REF INHIB" у формулі нижче) була зафіксована й експортована з FLIPR.

Ефект сполуки розраховується як % інгібування за такою формулою:

$$\% \text{інгібування} = \frac{\text{RFU агента, що тестується} - \text{Середнє значення RFU еталонного інгібування за планшетом}}{\text{Середнє значення RFU контролю за планшетом} - \text{Середнє значення RFU еталонного інгібування за планшетом}} \times 100$$

де "RFU" являє собою відносні флуоресцентні одиниці.

Результати цих аналізів показані в Таблиці 2 нижче, де "A" означає IC<sub>50</sub>, менше або рівне 50 нМ; "B" - IC<sub>50</sub> більше 50 нМ і менше або рівне 500 нМ; "C" - IC<sub>50</sub> більше 500 нМ і менше 1 мкМ; "D" - IC<sub>50</sub> 1 мкМ або більше; і "NT" вказує, що сполука не пройшла перевірку.

Приклад 25. Аналіз активності TRPC5

ICLN-1633 клітини (HEK-TREx hTRPC5), які експресують TRPC5, отримували наступним чином. Комерційно доступні клітини НекТrex-293 висівали з розрахунку  $0.7 \times 10^6$  клітин/лунку в 1 × 6-лунковий планшет за 24 години до трансфекції з використанням 2 мл середовища для росту клітин, що не містить антибіотиків (1x DMEM/високий вміст глюкози (Hyclone # SH30022.02); 10 % фетальна бичача сироватка (Sigma) 2 мМ піруват натрію, 10 мМ HEPES). Кодуюча послідовність людського TRPC5 (NM\_012471 з мовчазною мутацією T478C) була клонована в рсDNA5/TO (Invitrogen; Cat No. V103320) з використанням гігроміцину як гена стійкості і плазміди (SEQ ID NO: 2), розмноженої з використанням T-Rex-293. клітини (Invitrogen; Cat No. R71007) відповідно до інструкцій виробника. На 2 день готували 2 мкг плазмідної ДНК плюс 6 мкл реагенту Xtreme-GENE HP в Opti-mem (загальний об'єм 200 мкл) і інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. Цей розчин плазміди потім акуратно по краплях наносили на кожну лунку, і планшет обережно похитували для змішування комплексу з середовищем протягом приблизно 30 секунд. Трансфіковані клітини інкубували при 37 °C в інкубаторі з 10 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Трансфіковані клітини збирали і переносили в чашки розміром 2 × 150 мм, що містять середовище для росту клітин без антибіотиків, при 37 °C.

На наступний день для створення стабільного пулу ініціювали селекцію шляхом додавання середовища для росту клітин, що містить 150 мкг/мл гігроміцину і 5 мкг/мл бластицидину, і давали клітинам можливість рости. Середовище із селекційним агентом міняли кожні 1-2 дні в міру необхідності для видалення мертвих клітин. Через 7 днів концентрація гігроміцину знизилася до 75 мкг/мл, і ріст клітин продовжився.

Окремі клони відбирали наступним чином. Стабільний пул розбавляли до 10 клітин/мл і висівали (100 мкл/лунку) в 24 × 96-лункові планшети (~ 1 клітка/лунку) і дозволяли рости протягом 7 днів в середовищі для росту клітин. Додавали свіже середовище (100 мкл) і клітинам давали можливість рости протягом ще 1-2 тижнів, а потім зберігали замороженими або відразу використовували.

Сполуку готували або поставляли у вигляді 10 мМ вихідного розчину, як правило, з використанням ДМСО в якості несучого середовища. Криві доза-відповідь по 10 точкам були побудовані з використанням акустичного дозатора Echo-550. Планшети з джерелами сполуки були виготовлені шляхом серійного розведення вихідних матеріалів сполук для створення 10 мМ, 1 мМ і 0,1 мМ розчинів в ДМСО в сертифікованих Echo планшетах LDV. Потім Echo послідовно наносив 100 % вихідні розчини ДМСО у вихідні доза-відповідні планшети для створення схеми 4-кратного розведення. 100 % ДМСО додавали в планшети з плямами залежності від дози, щоб довести кінцевий об'єм до 5 мкл. Потім 300 мкл вихідного планшета доза-відповідь вносили в планшети для попередньої інкубації і аналізу стимуляції. Потім в планшети додавали 50 мкл буфера для попередньої інкубації і 100 мкл буфера для стимуляції, в результаті чого кінцевий діапазон тестових концентрацій для аналізу становив від 30 мкМ до 0,0001 мкМ з кінцевою концентрацією ДМСО 0,3 %.

Клітини людини, які експресують ICLN-1633, висівали на 384-лункові чорні покриті PDL мікропланшети, і витримували в середовищі для вирощування TRPC5 за день до використання в експериментах. Експресію TRPC5 індукували застосуванням тетрацикліну 1 мкг/мл під час посіву. Середовище видаляють з планшетів і до клітин додають 10 мкл 4 мкМ Fluo-4 AM (змішаного з рівним об'ємом Pluronic F-127) в EBSS. Клітини інкубують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60-90 хвилин. Після інкубаційного періоду барвник видаляють і замінюють 10 мкл EBSS. Планшети для клітин, попередньої інкубації і стимуляції завантажують в FLIPR-II і починають аналіз. FLIPR вимірює 10-секундний базовий рівень, а потім додає 10 мкл 2X сполук (або контролів). За змінами флуоресценції стежать ще 5 хвилин. Після 5-хвилинної попередньої інкубації в планшет з клітинами додають 20 мкл 2X рилузолу (з 1X сполукою або контролями). Кінцева концентрація стимуляції рилузолом в аналізі становить 30 мкМ. Після додавання рилузолу відстежують зміни флуоресценції протягом додаткових 5 хвилин.

Сполуку модуляції кальцієвої відповіді TRPC5 визначали наступним чином. Після введення Енглерину А флуоресценцію відстежували протягом 5-хвилинного періоду. Максимальний відносний відгук флуоресценції (мінус контрольна відповідь 1 мкМ сполуки внутрішнього контролю, яка, як відомо, максимально блокує кальцієву відповідь TRPC5, "REF INHIB" в наведеній нижче формулі) був зафіксований і експортований з FLIPR.

Ефект сполуки розраховується як % інгібування за такою формулою:

$$\% \text{інгібування} = \frac{\text{RFU агента, що тестується} - \text{Середнєзначення RFU еталонного інгібування за планшетом}}{\text{Середнєзначення RFU контролю за планшетом} - \text{Середнєзначення RFU еталонного інгібування за планшетом}} \times 100$$

де "RFU" являє собою відносні флуоресцентні одиниці.

Результати цих аналізів показані в Таблиці 2 нижче, де "A" означає IC<sub>50</sub>, менше або рівне 50 нМ; "B" - IC<sub>50</sub> більше 50 нМ і менше або рівне 500 нМ; "C" - IC<sub>50</sub> більше 500 нМ і менше 1 мкМ; "D" - IC<sub>50</sub> 1 мкМ або більше; і "NT" вказує, що сполука не пройшла перевірку.

Таблиця 2

TRPC4 і TRPC5 активності сполук, що наводяться як приклади

Сполука	TRPC5	TRPC4
116	A	A
117	A	B
117a	D	Не тестували (NT)
118	B	B
119	A	A
120	A	A
121	A	Не тестували (NT)
122	A	Не тестували (NT)
123	B	Не тестували (NT)

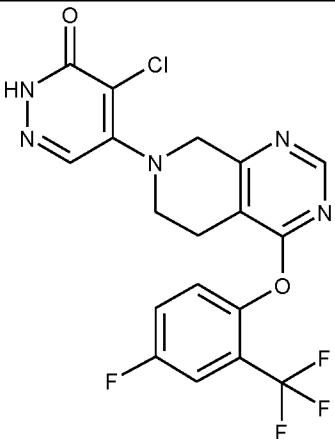
Сполука	TRPC5	TRPC4
100	A	A

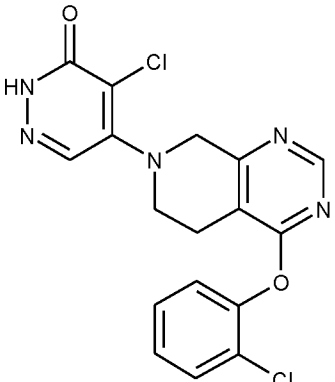
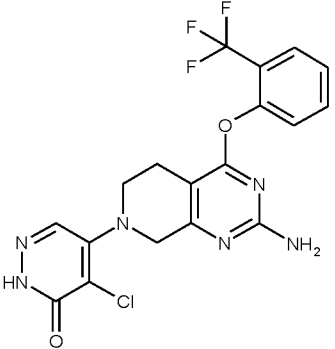
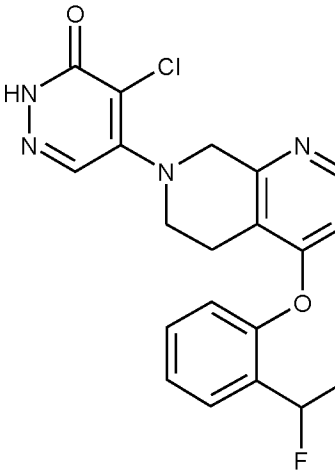
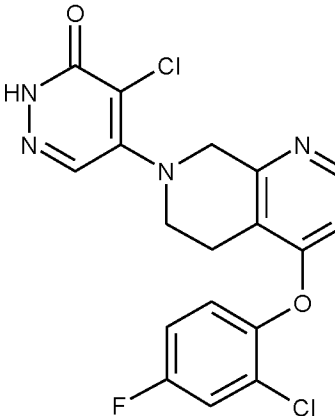
Сполука	TRPC5	TRPC4
101	A	A
102	A	A
103	A	A
104	A	A
105	A	A
106	A	B
107	A	B
108	B	C
109	A	B
110	B	A
111	B	Не тестували (NT)
112	A	B
113	A	B
114	A	A
115	B	B

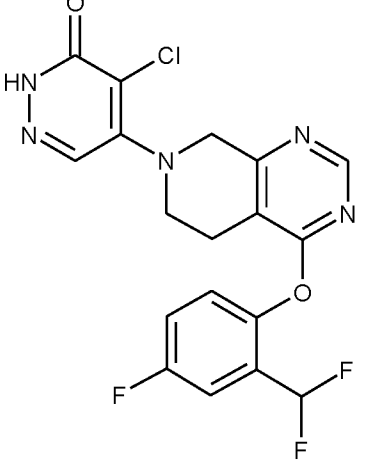
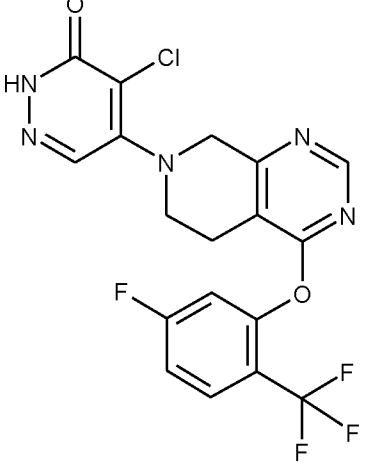
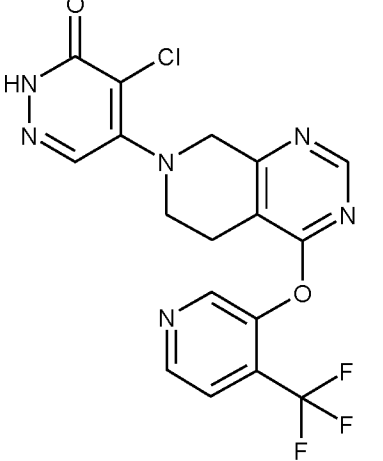
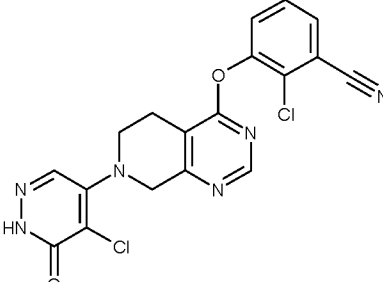
Сполука	TRPC5	TRPC4
135	A	Не тестували (NT)
136	A	Не тестували (NT)
137	A	Не тестували (NT)
138	B	Не тестували (NT)
139	B	Не тестували (NT)
140	B	Не тестували (NT)

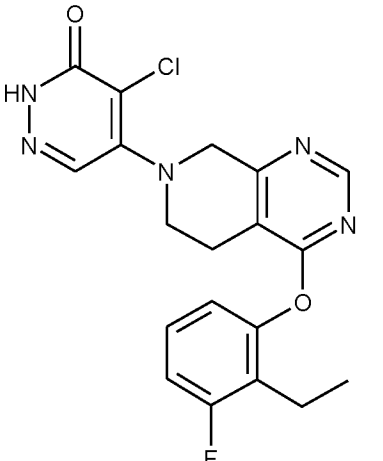
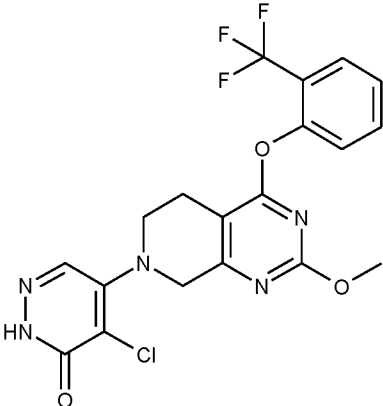
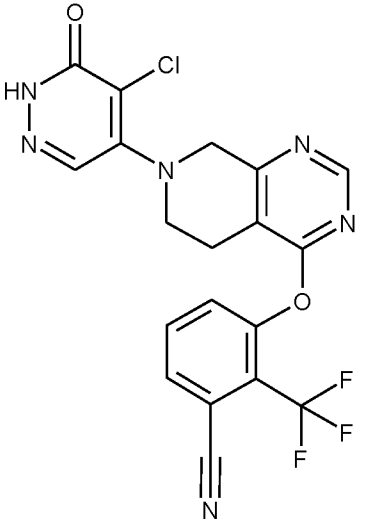
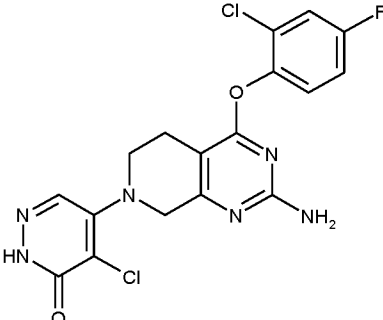
Сполука	TRPC5	TRPC4
124	A	Не тестували (NT)
125	A	Не тестували (NT)
126	A	Не тестували (NT)
126a	B	Не тестували (NT)
127	B	Не тестували (NT)
128	A	Не тестували (NT)
129	A	Не тестували (NT)
130	A	Не тестували (NT)
131	A	Не тестували (NT)
132	B	Не тестували (NT)
133	B	Не тестували (NT)
133a	C	Не тестували (NT)
134	A	Не тестували (NT)

5 <sup>1</sup>H ЯМР і МС дані для вибраних сполук представлені в таблиці нижче:

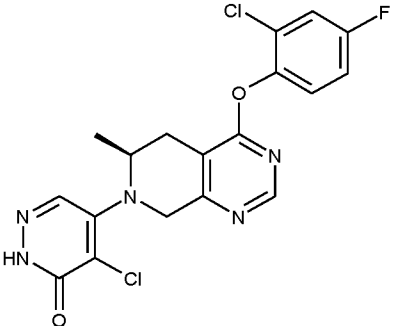
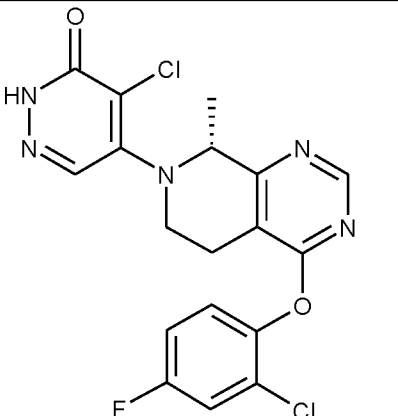
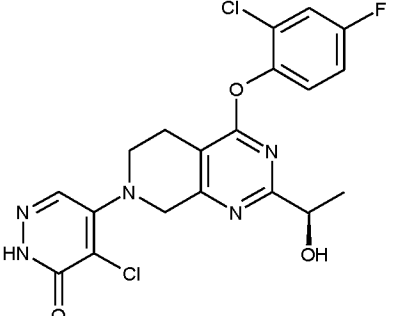
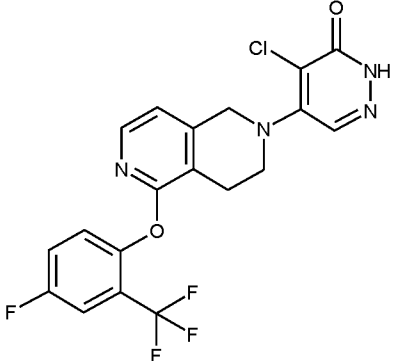
Сполука	Структура	ЯМР	МС
100		<p><sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,79 (дд, J=8,4, 3,0 Гц, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,70 – 7,59 (м, 1H), 4,68 (с, 2H), 3,79 (т, J=5,6 Гц, 2H), 2,98 (с, 2H).</p>	442

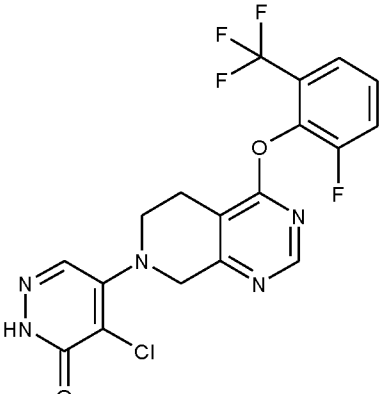
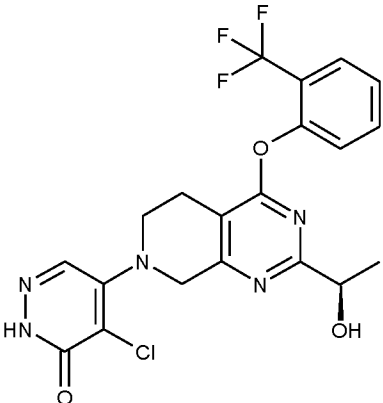
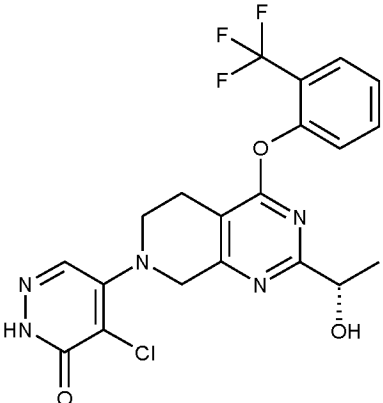
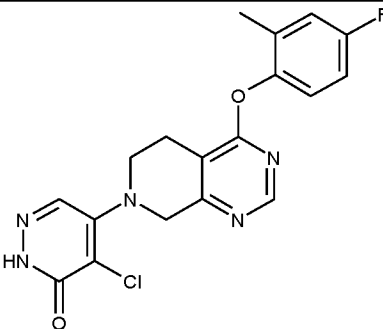
Сполука	Структура	ЯМР	МС
101		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,63 (дд, J=8,0, 1,4 Гц, 1H), 7,51 – 7,40 (м, 2H), 7,36 (тд, J=7,4, 2,2 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,80 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,03 (т, J=5,7, Гц, 2H).</p>	390
102		<p>1H ЯМР (400 МГц, Метанол-d4) хімічні зсуви 8,00 (с, 1H), 7,79 – 7,67 (м, 2H), 7,44 (дд, J=13,1, 7,9 Гц, 2H), 4,51 (с, 2H), 3,87 (т, J=5,8 Гц, 2H), 2,93 (т, J=5,6 Гц, 2H).</p>	439
103		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,71 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,65 (т, J=7,9 Гц, 1H), 7,46 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,40 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,13 (т, J=54,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,03 (т, J=5,7 Гц, 2H).</p>	406
104		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,97 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,66 (дд, J=8,3, 3,0 Гц, 1H), 7,51 (дд, J=8,9, 5,3 Гц, 1H), 7,42 – 7,24 (м, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,80 (т, J=5,9 Гц, 2H), 3,02 (с, 2H).</p>	407

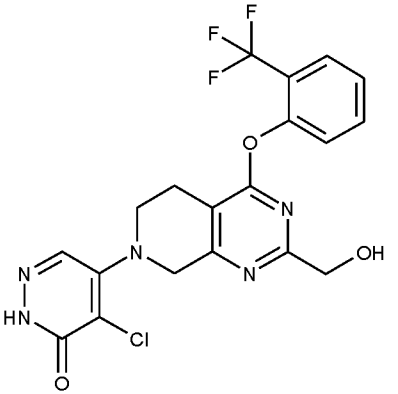
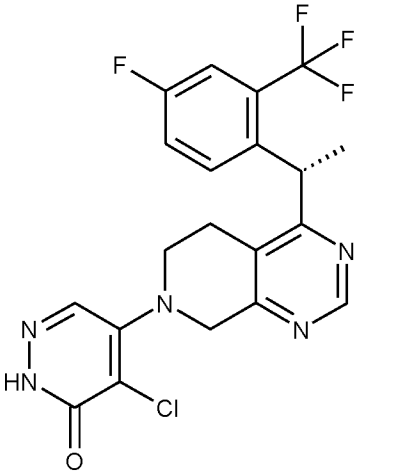
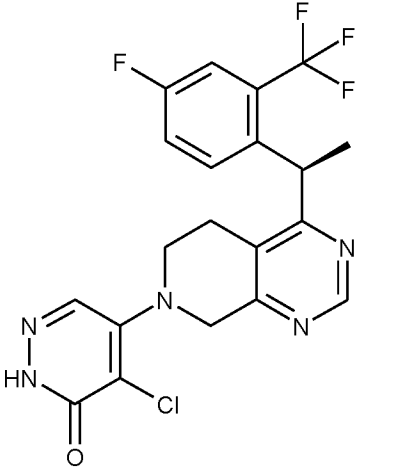
Сполука	Структура	ЯМР	МС
105		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,51 (ддд, J=14,3, 10,8, 6,8 Гц, 3H), 7,13 (т, J=53,9 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,03 (т, J=5,8 Гц, 2H).</p>	424
106		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,95 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,62 (д, J=9,7 Гц, 1H), 7,41 (с, 1H), 4,69 (с, 2H), 3,80 (с, 2H), 2,98 (с, 2H).</p>	442
107		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,91 (с, 1H), 8,79 (д, J=4,9 Гц, 1H), 8,59 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,92 (д, J=5,0 Гц, 1H), 4,70 (с, 2H), 3,81 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,02 (с, 2H).</p>	425
108		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,99 (дд, J=7,8, 1,5 Гц, 1H), 7,86 (дд, J=8,3, 1,5 Гц, 1H), 7,69 (т, J=8,0 Гц, 1H), 4,69 (с, 2H), 3,81 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,08 – 3,01 (м, 2H).</p>	415

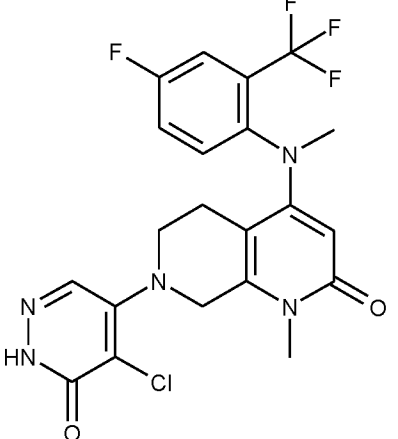
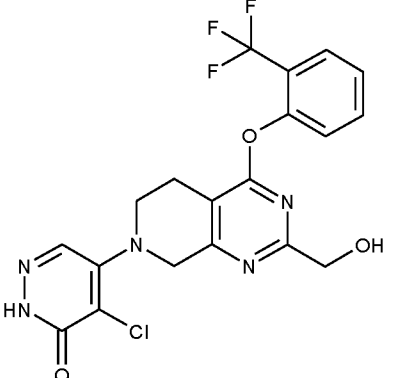
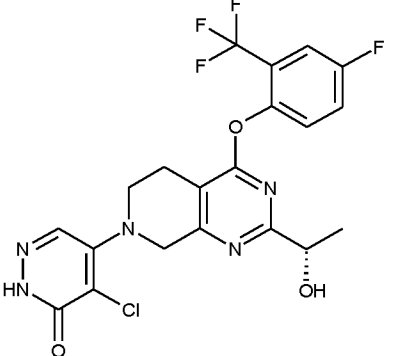
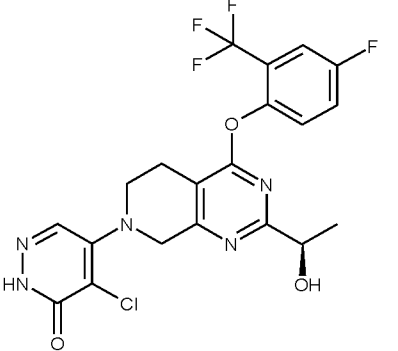
Сполука	Структура	ЯМР	МС
109		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,01 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,38 – 7,28 (м, 1H), 7,15 (т, J=8,9 Гц, 1H), 7,06 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,80 (т, J=5,8 Гц, 2H), 3,03 (д, J=5,8 Гц, 2H), 2,48 (д, J=7,4 Гц, 2H), 1,05 (т, J=7.5 Гц, 3H).</p>	402
110		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,98 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,88 – 7,75 (м, 2H), 7,59 – 7,48 (м, 2H), 4,60 (с, 2H), 3,77 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,74 (с, 3H), 2,89 (т, J=5,6 Гц, 2H).</p>	454
111		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,01 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,13 (д, J=7,4 Гц, 1H), 8,07 – 7,99 (м, 2H), 7,96 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,70 (с, 2H), 3,81 (т, J=5,6 Гц, 2H), 3,01 (с, 2H).</p>	449
112		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,95 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,62 (дд, J=8,5, 3,1 Гц, 1H), 7,45 (дд, J=9,0, 5,3 Гц, 1H), 7,31 (тд, J=8,5, 2,9 Гц, 1H), 6,50 (с, 2H), 4,41 (с, 2H), 3,72 (д, J=6,0 Гц, 2H), 2,80 (с, 2H).</p>	423

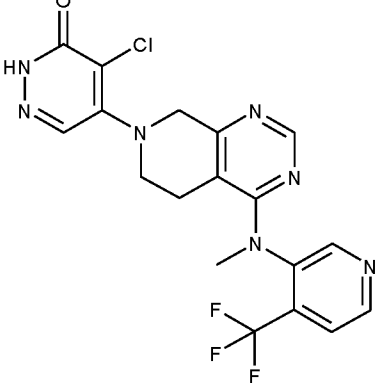
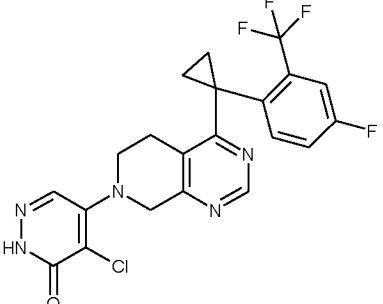
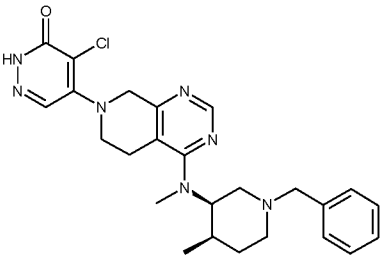
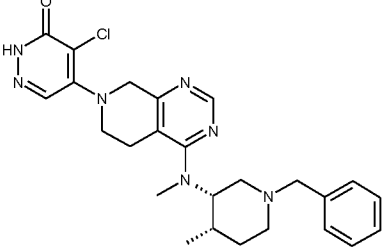
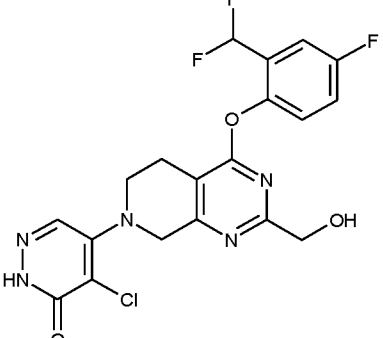
Сполука	Структура	ЯМР	МС
113		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,95 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,58 (дд, J=7,9, 1,5 Гц, 1H), 7,47 – 7,38 (м, 1H), 7,41 – 7,34 (м, 1H), 7,34 – 7,25 (м, 1H), 6,48 (с, 2H), 4,41 (с, 2H), 3,73 (т, J=5,8 Гц, 2H), 2,81 (д, J=5,7 Гц, 2H).	405
114		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,66 (дд, J=8,4, 3,0 Гц, 1H), 7,51 (дд, J=9,0, 5,3 Гц, 1H), 7,35 (тд, J=8,6, 3,0 Гц, 1H), 5,17 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,32 (д, J=6,3 Гц, 2H), 3,80 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,00 (д, J=6,4 Гц, 2H).	438
115		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,95 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,83 – 7,72 (м, 2H), 7,48 (дд, J=18,0, 8,2 Гц, 2H), 6,82 (с, 1H), 4,54 (с, 1H), 4,44 (с, 2H), 3,73 (т, J=5,6 Гц, 2H), 3,33 (м, 4H), 2,78 (с, 2H).	483
116		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,96 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,79 – 7,71 (м, 1H), 7,66 (тд, J=8,5, 3,0 Гц, 1H), 7,56 (дд, J=9,2, 4,6 Гц, 1H), 6,54 (с, 2H), 4,41 (с, 2H), 3,72 (т, J=5,8 Гц, 2H), 2,76 (т, J=5,7 Гц, 2H).	457
117*		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,04 (с, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,67 (дд, J=8,4, 2,5 Гц, 1H), 7,53 (дд, J=9,2, 5,3 Гц, 1H), 7,41 – 7,31 (м, 1H), 4,75 (д, J=18,1 Гц, 1H), 4,62 – 4,34 (м, 2H), 3,23 (дд, J=17,0, 6,0 Гц, 1H), 2,81 (д, J=17,1 Гц, 1H), 1,20 (д, J=6,6 Гц, 3H).	422

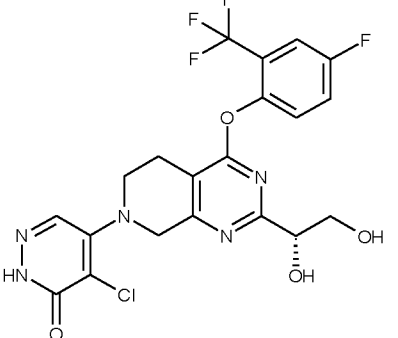
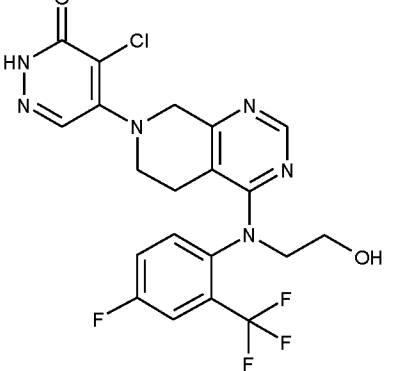
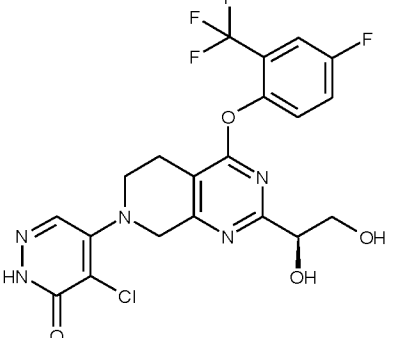
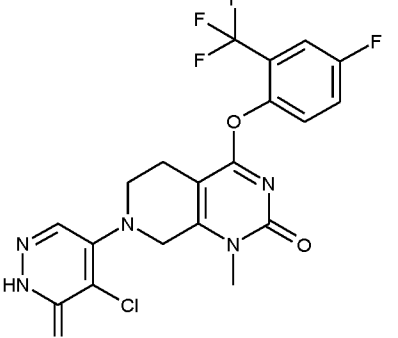
Сполука	Структура	ЯМР	МС
117a*		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,04 (с, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,67 (дд, J=8,6, 2,5 Гц, 1H), 7,58 – 7,50 (м, 1H), 7,36 (дд, J=9,9, 7,3 Гц, 1H), 4,76 (д, J=18,1 Гц, 1H), 4,63 – 4,40 (м, 2H), 3,23 (дд, J=17,3, 5,9 Гц, 1H), 2,81 (д, J=17,0 Гц, 1H), 1,20 (д, J=6,7 Гц, 3H).</p>	422
118		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,96 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,66 (дд, J=8,4, 3,0 Гц, 1H), 7,50 (дд, J=9,0, 5,3 Гц, 1H), 7,35 (тд, J=8,5, 3,0 Гц, 1H), 5,06 (кв, J=6,7 Гц, 1H), 4,00 (дд, J=14,1, 5,7 Гц, 1H), 3,68 (ддд, J=14,4, 11,1, 4,2 Гц, 1H), 3,06 (ддд, J=17,1, 11,2, 6,0 Гц, 1H), 2,98 – 2,88 (м, 1H), 1,60 (д, J=6,8 Гц, 3H).</p>	422
119		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,98 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,66 (дд, J=8,4, 3,0 Гц, 1H), 7,51 (дд, J=9,1, 5,3 Гц, 1H), 7,35 (тд, J=8,5, 3,0 Гц, 1H), 5,06 (д, J=5,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,48 (п, J=6,4 Гц, 1H), 3,80 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,99 (с, 2H), 1,22 (т, J=6,4 Гц, 3H).</p>	452
120		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,90 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,72 (дд, J=8,6, 3,1 Гц, 1H), 7,63 (тд, J=8,6, 3,1 Гц, 1H), 7,49 (дд, J=9,1, 4,6 Гц, 1H), 7,00 (д, J=5,2 Гц, 1H), 4,69 (с, 2H), 3,78 (т, J=5,8 Гц, 2H), 2,95 (т, J=5,9 Гц, 2H).</p>	441

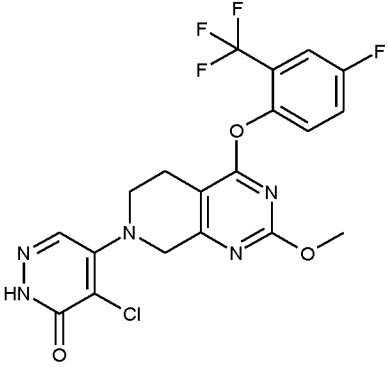
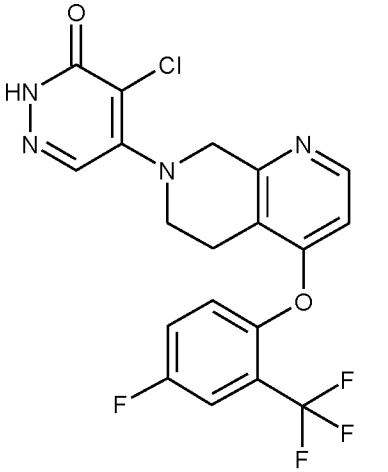
Сполука	Структура	ЯМР	МС
121		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,01 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,83 (т, J=9,2 Гц, 1H), 7,73 (д, J=7,9 Гц, 1H), 7,67 – 7,57 (м, 1H), 4,71 (с, 2H), 3,81 (т, J=5,8 Гц, 2H), 3,01 (с, 2H).</p>	442
122		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,88 – 7,75 (м, 2H), 7,57 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,51 (т, J=7,6 Гц, 1H), 5,07 (д, J=5,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,50 (п, J=6,2 Гц, 1H), 3,80 (т, J=5,6 Гц, 2H), 2,96 (с, 2H), 1,23 (д, J=6,5 Гц, 3H).</p>	468
123		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,88 – 7,75 (м, 2H), 7,57 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,51 (т, J=7,7 Гц, 1H), 5,07 (д, J=5,2 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,50 (п, J=6,4 Гц, 1H), 3,80 (т, J=5,6 Гц, 2H), 2,96 (с, 2H), 1,23 (д, J=6,6 Гц, 3H).</p>	468
124		<p>1H ЯМР (ДМСО-d6) δ: 12,97 (ш. с, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,01 (с, 1H), 7,15-7,24 (м, 2H), 7,05-7,12 (м, 1H), 4,63 (с, 2H), 3,78 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,00 (с, 2H), 2,06 (с, 3H)</p>	388,3

Сполука	Структура	ЯМР	МС
125		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,81 – 7,74 (м, 1H), 7,74 – 7,60 (м, 2H), 5,19 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,34 (д, J=6,3 Гц, 2H), 3,79 (т, J=5,6 Гц, 2H), 2,95 (с, 2H).</p>	472
126*		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,98 (с, 1H), 9,02 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,63 (дд, J=9,4, 2,6 Гц, 1H), 7,53 (п, J=8,7 Гц, 2H), 4,71 (т, J=7,1 Гц, 1H), 4,65 (с, 2H), 3,68 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,08 (д, J=16,5 Гц, 1H), 2,57 (с, 1H), 1,60 (д, J=6,8 Гц, 3H).</p>	454
126a*		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,97 (с, 1H), 9,02 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,63 (д, J=7,9 Гц, 1H), 7,60 – 7,49 (м, 2H), 4,72 (д, J=6,9 Гц, 1H), 4,65 (с, 2H), 3,68 (с, 2H), 3,08 (д, J=16,3 Гц, 1H), 2,58 (с, 1H), 1,60 (д, J=6,8 Гц, 3H).</p>	454

Сполука	Структура	ЯМР	МС
127		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,98 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,81 – 7,74 (м, 1H), 7,55 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,35 – 7,27 (м, 1H), 5,85 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 3,39 (с, 3H), 3,39 – 3,34(м, 2H), 3,09 (с, 3H), 1,95 (с, 2H).</p>	484
128		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,01 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,88 – 7,75 (м, 2H), 7,56 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,51 (т, J=7,7 Гц, 1H), 5,19 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,68 (с, 2H), 4,34 (д, J=6,3 Гц, 2H), 3,80 (т, J=5,7 Гц, 2H), 2,96 (с, 2H).</p>	454
129*		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,78 (дд, J=8,6, 2,9 Гц, 1H), 7,75 – 7,61 (м, 2H), 5,08 (д, J=5,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,50 (п, J=6,5 Гц, 1H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 2,94 (д, J=6,1 Гц, 2H), 1,23 (д, J=6,5 Гц, 3H).</p>	486
130*		<p>1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,00 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,78 (дд, J=8,6, 3,0 Гц, 1H), 7,67 (ддд, J=19,1, 8,6, 3,8 Гц, 2H), 5,08 (д, J=5,3 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,50 (п, J=6,5 Гц, 1H), 3,79 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,95 (с, 2H), 1,23 (д, J=6,6 Гц, 3H).</p>	486

Сполука	Структура	ЯМР	МС
131		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,07(с, 1H), 8,89 – 8,79 (м, 2H), 8,59 (с, 1H), 7,94 – 7,84 (м, 2H), 4,53 (с, 2H), 3,44 (д, J=11,0 Гц, 2H), 3,41 (с, 3H), 1,96 (т, J=5,6 Гц, 2H).	438
132		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,94 (с, 1H), 8,89 (с, 1H), 8,00 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,62 (д, J=8,6 Гц, 2H), 4,58 (с, 2H), 3,48 (с, 2H), 2,27 (с, 2H), 1,84 (с, 2H), 1,47 (с, 2H).	466
133		1H ЯМР (400 МГц, Метанол-d4) хімічні зсуви 8,34 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,33 (кв, J=7,8 Гц, 4H), 7,25 (т, J=7,0 Гц, 1H), 4,67 (д, J=17,3 Гц, 1H), 4,58 (д, J=17,2 Гц, 2H), 3,97 (д, J=13,9 Гц, 1H), 3,55 (с, 2H), 3,47 (с, 1H), 3,39 (с, 3H), 2,94 (с, 1H), 2,81 (д, J=15,8 Гц, 1H), 2,74-2,53 (м, 3H), 2,35 (с, 1H), 2,15 (с, 1H), 1,76 (с, 2H), 1,01 (д, J=7,0 Гц, 3H).	480
133a		1H ЯМР (400 МГц, Метанол-d4) хімічні зсуви 8,34 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,42 – 7,21 (м, 5H), 4,62 (кв, J=17,5 Гц, 3H), 3,97 (д, J=13,3 Гц, 1H), 3,55 (с, 2H), 3,47 (с, 1H), 3,39 (с, 3H), 3,15 (с, 1H), 2,94 (с, 1H), 2,87 – 2,61 (м, 3H), 2,35 (с, 1H), 2,15 (с, 1H), 1,76 (с, 2H), 1,01 (д, J=7,0 Гц, 3H).	480
134		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,01 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,58 – 7,49 (м, 3H), 7,27 – 7,00 (м, 1H), 5,17 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,66 (с, 2H), 4,34 (д, J=6,3 Гц, 2H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 2,99 (с, 2H).	454

Сполука	Структура	ЯМР	МС
135*		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,97 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,78 (дд, J=8,5, 3,0 Гц, 1H), 7,75 – 7,61 (м, 2H), 5,12 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,57 (т, J=6,0 Гц, 1H), 4,37 (кв, J=5,8 Гц, 1H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,57 (дт, J=11,2, 5,7 Гц, 1H), 3,46 (дт, J=10,8, 6,1 Гц, 1H), 2,96 (т, J=5,6 Гц, 2H).	502
136		1H ЯМР (400 МГц, Метанол-d4) хімічні зсуви 8,54 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,63 (дд, J=8,8, 3,0 Гц, 1H), 7,54 (с, 1H), 4,57 (м, 3H), 3,88 (с, 2H), 3,51 (м, 3H), 2,05 (с, 1H), 1,98 (с, 1H).	485
137*		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,94 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,78 (дд, J=8,5, 3,0 Гц, 1H), 7,75 – 7,61 (м, 2H), 5,12 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,57 (т, J=6,0 Гц, 1H), 4,37 (кв, J=5,7 Гц, 1H), 3,79 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,57 (дт, J=11,2, 5,7 Гц, 1H), 3,52 – 3,43 (м, 1H), 2,96 (т, J=5,6 Гц, 2H).	502
138		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 13,05 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,78 (дд, J=8,5, 3,1 Гц, 1H), 7,70 (тд, J=8,5, 3,2 Гц, 1H), 7,57 (дд, J=9,1, 4,6 Гц, 1H), 4,65 (с, 2H), 3,66 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,38 (с, 3H), 2,74 (т, J=5,4 Гц, 2H).	472

Сполука	Структура	ЯМР	МС
139		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,84 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,79 (дд, J=8,6, 2,9 Гц, 1H), 7,68 (дтд, J=18,8, 9,0, 3,8 Гц, 2H), 4,60 (с, 2H), 3,77 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,75 (с, 3H), 2,88 (т, J=5,7 Гц, 2H)	472
140		1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) хімічні зсуви 12,97 (с, 1H), 8,30 (д, J=5,6 Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,83 (дд, J=8,5, 3,2 Гц, 1H), 7,68 (тд, J=8,6, 3,1 Гц, 1H), 7,50 (дд, J=9,1, 4,5 Гц, 1H), 6,58 (д, J=5,6 Гц, 1H), 4,69 (с, 2H), 3,77 (т, J=5,7 Гц, 2H), 2,98 (т, J=5,8 Гц, 2H).	441

\* Сполука являє собою чистий ізомер, відокремлений від його протилежного ізомеру за допомогою ВЕРХ відповідної рацемічної суміші. Абсолютна орієнтація не визначена, тому позначення конкретної орієнтації навколо хірального центру довільне.

Приклад 26. Дія сполуки 100 на викликане пуроміцин амінонуклеозидом (PAN) пошкодження клубочків у пацюків

Мета

- 5 Метою цього дослідження є оцінка дозозалежних ефектів сполуки 100 на викликане PAN пошкодження клубочків нирок, індексоване по альбумінурії.

Способи:

- 10 Вісімдесят (80) самців пацюків Sprague-Dawley вагою близько 125-150 г і віком близько 5-6 тижнів були придбані у Charles River. Їх годували стандартною дієтою (Harlan 8640), утримували в стандартних умовах і дозволяли акліматизуватися протягом щонайменше 5 днів до початку дослідження.

На D-2 пацюків поміщали в групи лікування, зіставні за масою, і поміщали індивідуально в метаболічні клітки для збалансованості дослідження.

- 15 За 24-годинним вихідним рівнем (день 0) збирали сечу з подальшим забором вихідної крові за допомогою пункції вени в свідомості. Потім пацюкам вводили несуче середовище або тестований продукт.

- 20 Через дві (2) години після введення несучого середовища або тестованого агента в день 0 пацюкам вводили (5 мл/кг, підшкірно) несуче середовище (стерильний фізіологічний розчин) або пуроміцин-амінонуклеозид (PAN; провокаційна речовина; 75 мг/кг), розчинений в несучому середовищі.

Періодично (день 4, 7 і 10) визначали обсяги 24-годинної сечі і отримували зразки (4 зразка/тварину/момент часу; 0,5 мл/зразок). Крім того, періодично (4, 7 і 10 дні) зразки крові збирали за допомогою пункції вени в свідомості через 2 години  $\pm$  1 хвилину після введення дози AM.

- 25 Відразу після останнього взяття крові пацюків анестезували ізофлураном, збирали тканини і тварин умертвляли. Були отримані кінцеві маси і показники нирок.

Зразки сечі негайно заморожували в рідкому N<sub>2</sub> і зберігали при -80° С до аналізу.

Зразки цільної крові, зібрані на K<sub>3</sub>EDTA були оброблені відповідним чином для отримання плазми для вимірювань фармакінетики PK

Результати.

5 Як показано на Фігурі 1, лікування сполукою 100 в дозі 30 мг/кг один раз (QD) або два рази (BID) щодня призводило до зниження екскреції альбуміну з сечею після травми, викликаной PAN. Значне зниження спостерігалось через 7 і 10 днів при дозуванні BID і через 10 днів при дозуванні сполуки 100 QD. Мізорібін, сполука позитивного контролю, також був ефективним у зниженні альбумінурії.

Висновок.

10 Сполука 100 ефективно знижує альбумінурію в моделі пошкодження клубочків у пацюків PAN.

Приклад 27. Сполука 100 є ефективною в моделі FSGS трансгенного пацюка AT1R

15 Модель FSGS у трансгенних пацюків AT1R характеризується специфічною для подоцитів експресією людського AT1R. Було показано, що у чоловіків патологія значно важче, ніж у жінок. Ефективність інгібіторів TRPC5 на моделі AT1R була продемонстрована за допомогою інструментальної сполуки. Див. Zhou et al., Science (2017), vol. 358 (6368), 1332-1336.

20 В цьому дослідженні патофізіологія у трансгенних пацюків AT1R була прискорена за допомогою односторонньої нефректомії (UniNX) і інфузії AngII за допомогою мінінасоса. Сполуку 100 вводили перорально один раз на день в дозі 3 мг/кг або 10 мг/кг, і співвідношення білка і креатиніну в сечі визначали на -1, 0, 1, 2 і 3 тижнях лікування. На Фігурі 2 показано співвідношення білка і креатиніну в сечі в ході дослідження для пацюків, які отримували сполуку 100, або пацюків, які отримували несуче середовище. Проведення UniNX, введення AngII і сполуки 100 починали в зазначені моменти часу. На Фігурі 3 показані ті самі дані, представлені в % від вихідного рівня.

25 Результати показують, що сполука 100 ефективна в моделі FSGS у трансгенних пацюків AT1R.

ВКЛЮЧЕННЯ ЗА ПОСИЛАННЯМ

Всі патенти США і опубліковані патентні заявки США і PCT, цитовані в цьому документі, тим самим включені в нього за допомогою посилання.

30 ЕКВІВАЛЕНТИ

Наведений вище письмовий опис вважається достатнім для забезпечення реалізації на практиці цього винаходу спеціалістом у цій галузі. Цей винахід не повинен бути обмежений за обсягом прикладами, оскільки ці приклади призначені в якості єдиної ілюстрації одного аспекту винаходу, а інші функціонально еквівалентні варіанти реалізації входять в межі обсягу цього винаходу. Різні модифікації винаходу на додаток до показаних і описаних в цьому документі стануть очевидними для фахівців в цій області техніки з вищенаведеного опису і входять у межі обсягу формули винаходу, що додається. Переваги та об'єкти винаходу не обов'язково охоплюються кожним варіантом реалізації цього винаходу.

SEQ ID NO: 1 Послідовність плазмиди TRPC4

40 Послідовність ДНК плазмиди TRPC4, використаної в прикладі 24, наведена нижче. Підкреслені нуклеїнові кислоти являють собою нуклеїнові кислоти, що кодують TRPC4 людини.

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCC  
GCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGC GCGAGCA  
45 AAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG  
CGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA  
TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT  
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACG  
50 TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA  
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACSTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAG  
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG  
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAGTGTGCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATG  
55 GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATC  
TCCCTATCAGTGATAGAGATCGTACGACGAGCTCGTTTGTGACCCGTCAGATCGCCTGGAGACG  
CCATCCACGCTGTTTTGACSTCCATAGAAGACACCGGGACCCGATCCAGCTCCGGACTCTAGCG  
TTTAAACTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGACCATGGCCAGTTCTACTATAAGAGAAA  
CGTGAATGCCCTTACCGCGACAGAATCCCTGAGAATCGTGAGGGCAGAGTCCGAGCTGAG  
60 CCCATCCGAGAAGGCCTACCTGAACGCCGTGGAGAAGGGCGACTATGCCAGCGTGAAGAAGTC

CCTGGAGGAGGCCGAGATCTACTTTAAGATCAACATCAATTGCATCGATCCTCTGGGCAGAACC  
 GCCCTGCTGATCGCCATCGAGAACGAGAATCTGGAGCTGATCGAGCTGCTGCTGAGCTTCAACG  
 TGTATGTGGGCGATGCCCTGCTGCACGCCATCAGGAAGGAGGTGGTGGGAGCAGTGGAGCTGC  
 5 TGCTGAATCAACAAGCCAAGCGGAGAGAAGCAGGTGCCACCTATCCTGCTGGACAAGCAGTT  
 CTCCGAGTTTACCCAGATATCACACCCATCATCCTGGCCGCCACACCAACAATTACGAGATCA  
 TCAAGCTGCTGGTGCAGAAGGGCGTGTCCGTGCCTCGCCCACACGAGGTGCGGTGCAACTGCG  
 TGGAGTGGTGGAGCTCCTCTGACGTGGATTCTCTGAGGCACAGCCGGAGCCGGCTGAACATCTA  
 10 TAAGGCCCTGGCCTCCCATCTCTGATCGCCCTGAGCTCCGAGGACCCCTTCTGACCGCCTTT  
 CAGCTGTCTTGGGAGCTGCAGGAGCTGAGCAAGGTGGAGAACGAGTTTAAGAGCGAGTACGAG  
 GAGCTGTCCAGACAGTGAAGCAGTTCCGCAAGGACCTGCTGGATCAGACACGCTCTAGCCGG  
 GAGCTGGAGATCATCCTGAACTATAGGGACGATAATTCTCTGATCGAGGAGCAGAGCGGAAACG  
 ACCTGGCAGCCTGAAGCTGGCCATCAAGTACCGGCAGAAAGGAGTTCTGCGCCAGCCTAATT  
 15 GTCAGCAGCTGCTGCCCTCCCGTGGTATGATGAGTTTCCAGGATGGCGGAGAAGGCACTGGG  
 CAGTGAAGATGGTGCCTGCTTCATCATCGGCCTGCTGTTCCCGTGTTACGCGTGTGCTACCT  
 GATCGCCCTAAGTCTCCACTGGGCCTGTTTATCCGGAAGCCTTTCATCAAGTTTATCTGCCACA  
 CCGCCAGCTATCTGACATTCCTGTTTCTGCTGCTGCTGGCCTCCAGCACATCGACAGATCTGAT  
 CTGAACAGGCAGGGCCACCCCTACCATCGTGGAGTGGATGATCCTGCCATGGGTGCTGGGC  
 20 TTCATCTGGGGCGAGATCAAGCAGATGTGGGACGGCGGCCTGCAGGACTACATCCACGATTGG  
 TGGAACCTGATGGATTTTGTGATGAATCCCTGTACCTGGCCACAATCTCTCTGAAGATCGTGGC  
 CTTCTGTAAGTATAGCGCCCTGAATCCAGAGAGTCTGGGACATGTGGCACCCCTACCCTGGTG  
 GCAGAGGCCCTGTTGCAATCGCCAACATCTTTTCTCTCTGCGCCTGATCAGCCTGTTTACAGC  
 CAATTCCACCTGGGACCACTGCAGATCTCCCTGGGACGGATGCTGCTGGATATCCTGAAGTTC  
 25 CTGTTTATCTACTGCCTGGTGTGCTGCTGGCCTTCGCCAACGGCCTGAATCAGCTGTACTTCTACTA  
 TGAGGAGACCAAGGGCCTGACATGCAAGGGCATCCGCTGTGAGAAGCAGAACAATGCCTTCAG  
 CACCCTGTTTCGAGACACTGCAGTCTCTGTTCTGGAGCATCTTTGGCCTGATCAACCTGTACGTGA  
 CCAATGTGAAGGCCAGCACGAGTTCACAGAGTTTGTGGGCGCCACCATGTTCCGGCACATACAA  
 CGTGATCTCTCTGGTGGTGTGCTGCTGAATATGCTGATCGCCATGATGAACAATAGCTATCAGCTGA  
 30 TCGCCGACCACGCCGATATCGAGTGGAAAGTTCGCCCGGACCAAGCTGTGGATGTCTACTTTGA  
 GGAGGGCGGCACCCTGCCACACCTTTCAACGTGATCCCATCCCCAAGTCTCTGTGGTATCTG  
 ATCAAGTGGATCTGGACACACCTGTGCAAGAAGAAGATGCGCCGGAAGCCTGAGAGCTTTGGCA  
 CCATCGGCGTGCACACACAGCACAGAAGGGCAGCAGACAACCTGCGCCGGCACCACCAGTACC  
 AGGAAGTGTGCGCAATCTGGTGAAGCGGTATGTGGCCGCCATGATCAGGGACGCAAAGACCG  
 AGGAGGGACTGACAGAGGAGAACTTCAAGGAGCTGAAGCAGGATATCAGCTCCTTCAGATTTGA  
 35 GGTCTGGGCTGCTGAGGGGCAGCAAGCTGTCCACCATCCAGTCCGCCAACCCCTAAGGA  
 GTCTAGCAATTCGCGCAGCGATGAGAAGAGCGACTCCGAGGGCAACTAAGGATAAGAAG  
 AAGAACTTCAGCCTGTTTACCTGACCACACTGATCCACCCACGCAGCGCCGCAATCGCATCCG  
 AGCGGCACAACATCTCCAATGGCTCTGCCCTGGTGGTGCAGGAGCCACCAAGAGAGAAGCAGA  
 GGAAGGTGAACCTTTGTGACAGATATCAAGAATTCGGCCTGTTTACAGAAGGAGCAAGCAGAAC  
 40 GCCGCCGAGCAGAACGCCAATCAGATCTTCTCTGTGAGCGAGGAGGTGGCAAGACAGCAGGCA  
 GCAGGACCACTGGAGAGGAATATCCAGCTGGAGAGCCGGGGACTGGCAAGCAGGGGCGACCT  
 GTCCATCCCAGGACTGTCTGAGCAGTGCCTGCTGGTGGACCACAGGGAGCGGAACACCGATAC  
 ACTGGGACTGCAAGTGGGCAAGCGGGTGTGCCCTTTCAAGAGCGAGAAGGTGCTGGTGGAGGA  
 CACCGTGCCCATCATCCCTAAGGAGAAGCACGCCAAGGAGGAGGATTCTCTATCGACTACGAT  
 45 CTGAATCTGCCAGACACCGTGACACACGAGGATTATGTGACCACAAGGCTGTGAGCGGCCGCTC  
 TAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT  
 GTTTGGCCCTCCCGCTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTCTAATA  
 AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG  
 CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT  
 50 ATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGC  
 GGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC  
 CTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCA  
 AGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAA  
 AACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCCCTTTG  
 55 ACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC  
 TCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG  
 ATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCC  
 CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAAGTGTGG  
 AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCAATCTCAATTAGTCAGCAACC  
 60 AATGTCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGC  
 CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAGCTATTC

CAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTA  
 TATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACACACGCGACGTCTGTCGAG  
 AAGTTTCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT  
 5 CTCTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGA  
 TGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCGCGCTCCCGATTCCGGAAG  
 TGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGT  
 CAGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCAT  
 GGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCCGACCGCAAGG  
 10 AATCGGTCAATACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACT  
 GGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGC  
 TTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATG  
 TCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCTATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGATT  
 CCCAATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGAC  
 GCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCT  
 15 CCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTCGATGATGCAGCTTGGG  
 CGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGGCGTACACAAATCG  
 CCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGAAACC  
 GACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTTGATTCCACCGC  
 CGCCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAG  
 20 CGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA  
 CAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGT  
 TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCG  
 TAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGA  
 GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT  
 25 GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA  
 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTG  
 CGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA  
 CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACC  
 GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAA  
 30 TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT  
 GGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC  
 TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT  
 CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATC  
 CGGTAACACTATCGTCTTGAGTCCAACCCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCACCCT  
 35 GGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTA  
 ACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA  
 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGTTGGTTTTTTGTTTG  
 CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT  
 CTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATC  
 40 TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTG  
 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC  
 CATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC  
 AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC  
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA  
 45 TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTG  
 CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACG  
 ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGA  
 TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT  
 CTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGA  
 50 GAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCAC  
 ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAACCGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATC  
 TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT  
 ACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGGAATAA  
 GGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGG  
 55 GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGC  
 GCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

SEQ ID NO: 2 Послідовність плазміди TRPC5

Послідовність ДНК плазміди TRPC5, використаної в прикладі 25, наведена нижче. Підкреслені нуклеїнові кислоти являють собою нуклеїнові кислоти, що кодують TRPC5 людини.

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCC  
GCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCA  
AAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG  
CGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA  
5 TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT  
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACG  
TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA  
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG  
10 TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG  
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
TTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCTGTAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAATG  
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATC  
TCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACG  
15 CCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGCG  
TTTAAACTTAAGCCCAAGCTGGCTAGACCGCCATGGCCCAACTGTACTACAAAAGGTCAACTAC  
TCACCGTACAGAGACCGCATCCCCCTGCAAATTGTGAGGGCTGAGACAGAGCTCTCTGCAGAGG  
AGAAGGCCTTCTCAATGCTGTGGAGAAGGGGGACTATGCCACTGTGAAGCAGGCCCTTCAGGA  
GGCTGAGATCTACTATAATGTTAACATCAACTGCATGGACCCCTTGGGCCGGAGTGCCCTGCTC  
20 ATTGCCATTGAGAACGAGAACCTGGAGATCATGGAGCTACTGCTGAACCACAGCGTGTATGTGG  
GTGATGCATTGCTCTATGCCATACGCAAGGAAGTGGTGGGCGCTGTGGAGCTTCTGCTCAGCTA  
CAGGCGGCCAGCGGAGAGAAGCAGGTCCCCTCTGATGATGGACACGCAGTTCTCTGAATT  
CACACCGGACATCACTCCCATCATGCTGGCTGCCACACCAACAACCTACGAAATCATCAAACCTGC  
TTGTCCAAAACGGGTCACTATCCCACGGCCCCACCAGATCCGCTGCAACTGTGTGGAGTGTGT  
25 GTCTAGTTCAGAGGTAGACAGCCTGCGCCACTCTCGCTCCCGACTGAACATCTATAAGGCTCTG  
GCAAGCCCCTCACTCATTGCCTTATCAAGTGAGGACCCCATCCTAACTGCCTTCCGTCTGGGCT  
GGGAGCTCAAGGAGCTCAGCAAGGTGGAGAATGAGTTCAAGGCCGAGTATGAGGAGCTCTCTC  
AGCAGTGCAAGCTCTTTGCCAAAGACCTGCTGGACCAAGCTCGGAGCTCCAGGGAAGTGGAGAT  
CATCCTCAACCATCGAGATGACCACAGTGAAGAGCTTGACCCTCAGAAGTACCATGACCTGGCC  
30 AAGTTGAAGGTGGCAATCAATACCACCAGAAAGAGTTTGTTGCTCAGCCCAACTGCCAACAGTT  
GCTTGCCACCCTGTGGTATGATGGCTTCCCTGGATGGCGGCGGAAACACTGGGTAGTCAAGCTT  
CTAACCTGCATGACCATTGGGTTCCCTGTTTCCCATGCTGTCTATAGCCTACCTGATCTCACCCAG  
GAGCAACCTTGGGCTGTTTCATCAAGAAACCCCTTATCAAGTTTATCTGCCACACAGCATCCTATTT  
GACCTTCCCTTTATGCTTCTCCTGGCTTCTCAGCACATTGTCAGGACAGACCTTCATGTACAGG  
35 GGCCTCCCCCAACTGTCGTGGAATGGATGATATTGCCTTGGGTTCTAGGTTTCATTGGGGTGA  
GATTAAGGAAATGTGGGATGGTGGATTTACTGAATACATCCATGACTGGTGAACCTGATGGATT  
TTGCAATGAACTCCCTCTACCTGGCAACTATTTCCCTGAAGATTGTGGCCTATGTCAAGTATAATG  
GTTCTCGTCCAAGGGAGGAATGGGAAATGTGGCACCCGACTCTGATTGCGGAAGCACTCTTCGC  
AATATCCAACATTTTAAGTTCGTTGCGTCTCATATCCCTGTTACAGCCAACTCCCCTTAGGACC  
40 TCTGCAGATCTCTTTGGGACGCATGCTGCTTGATATCCTCAAATTCCTCTTTATCTACTGCCTGGT  
ACTACTAGCTTTTGCCAATGGACTGAACCAGCTTTACTTCTATTATGAAACCAGAGCTATCGATGA  
GCCTAACAACTGCAAGGGGATCCGATGTGAGAAACAGAACAATGCCTTCTCCACGCTCTTTGAG  
ACTCTTCAGTCACTCTTCTGGTCTGTATTTGGCCTTTTAAATCTATATGTCACCAATGTGAAAGCC  
AGACACGAATTCACCGAGTTTGTAGGAGCTACCATGTTTGAACATACAATGTCATCTCCCTGGT  
45 AGTGCTGCTGAACATGCTGATTGCTATGATGAACAACCTCCTATCAGCTTATTGCCGATCATGCTG  
ATATCGAGTGGAAGTTTGAAGGACGAAGCTCTGGATGAGTTACTTTGATGAAGGTGGCACCTTG  
CCACCTCCTTTCAACATCATCCCCAGCCCCAAGTCATTTCTATACCTTGGTAACTGGTTCAACAAC  
ACCTTCTGCCCAAAGAGACCCCTGACGGTAGACGGAGAAGGCGCAACTTGAGAAGTTTCACAG  
AACGCAATGCTGACAGCCTGATACAAAATCAACATTATCAGGAAGTTATCAGGAATTTAGTCAAAA  
50 GATATGTGGCTGCTATGATAAGAAATTCAAAACACATGAGGGACTTACAGAAGAAAATTTTAAG  
GAATTAAGCAAGACATCTCCAGCTTTCGGTATGAAGTGCTTGACCTCTTGGGAAATAGAAAACA  
TCCAAGGAGCTTTTCCACTAGCAGCACTGAACTGTCTCAGAGAGACGATAATAATGATGGCAGTG  
GTGGGGCTCGGGCCAAATCCAAGAGTGTCTCTTTTAAATTTAGGCTGCAAGAAAAAGACTTGCCAT  
GGGCCACCTCTCATCAGAACCATGCCAAGGTCCAGTGGTGCCCAAGGAAAGTCAAAGCTGAGT  
55 CATCAAGCAAACGCTCCTTCATGGGTCTTCTCTCAAGAACTGGGTCTCCTATTCTCAAATTTA  
ATGGTCAATGTCTGAACCCAGTTCAGAGCCAATGTACACAATTTCTGATGGAATTTGTTGAGCAG  
CACTGTATGTGGCAGGACATCAGATATTCTCAGATGGAGAAAGGGAAAGCAGAGCCCTGTTCTC  
AAAGTGAATTAACCTCAGTGAGGTAGAATTAGGTGAAGTCCAGGGCGCTGCTCAGAGCAGTGA  
ATGCCCTAGCCTGTTCCAGCTCTCTTCACTGTGCATCCAGCATCTGCTCCTCAAATTTCAAACCT  
60 TTAGACTCCTCAGAGGATGATTTGAAACTTGGGGAGAGGCTTGTGACTTGTCTCATGCACAAAT

GGGGTGATGGACAGGAAGAACAAGTTACAACCTCGCCTCTAATGACTCGAGTCTAGAGGGGCCCGT  
 TAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCC  
 CCGTGCCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATT  
 5 GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG  
 GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAG  
 GCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC  
 GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCT  
 CTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG  
 10 GGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGG  
 GTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC  
 CACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTC  
 TTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAA  
 TTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCGAGCTCCCCA  
 GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCGAG  
 15 GCTCCCGAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC  
 CCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGA  
 CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG  
 AGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCG  
 GATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAAGTTTCTGATC  
 20 GAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCA  
 GCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAA  
 AGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTG  
 GGAATTACAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGA  
 CCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTGCAGGAGGCCATGGATGCGATCGC  
 25 TGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCATTCCGACCCGAAGGAATCGGTCAATA  
 CACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGA  
 TGGACGACACCGTCAAGTGCCTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGG  
 ACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAA  
 TGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGATTCCAATACGAGGT  
 30 CGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAG  
 CGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTT  
 GACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTGCAT  
 GCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCG  
 CGGCGCTCTGACCCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCCGACGCCAGCA  
 35 CTCGTCCGAGGGCAAAGGAATGACACGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACCCCGCTTCTATGA  
 AAGTTGGGCTTCCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCT  
 CATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTATTGAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA  
 TAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC  
 ATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTGCACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCA  
 40 TAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT  
 AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC  
 CCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA  
 GAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCT  
 TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG  
 45 GATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC  
 GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA  
 GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCT  
 CGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGA  
 AGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAA  
 50 GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT  
 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA  
 GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
 TAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA  
 GCTCTTGATCCGGCAAACAACCCGCTGGTAGCGGTTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATT  
 55 ACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG  
 GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCT  
 TTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC  
 CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTACCTCATTGCTGCTGA  
 CTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGA  
 60 TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC



або її фармацевтично прийнятна сіль, де:

R<sup>1</sup> являє собою хлор, -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub> або -CH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> являє собою водень або фтор; і

5 R<sup>3</sup> являє собою водень, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH або CH(OH)-CH<sub>2</sub>OH.

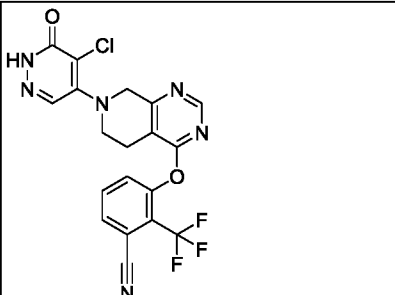
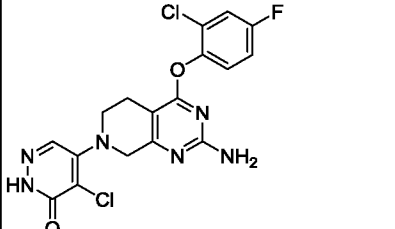
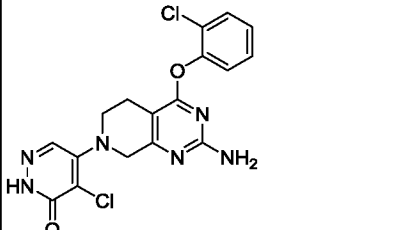
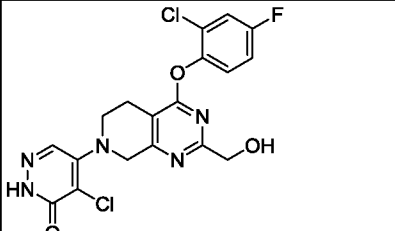
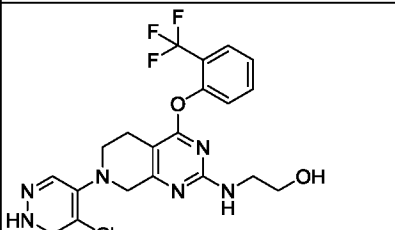
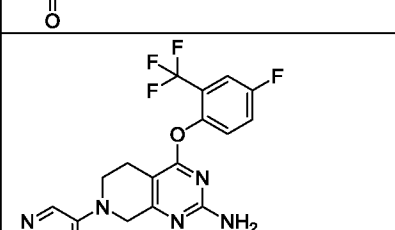
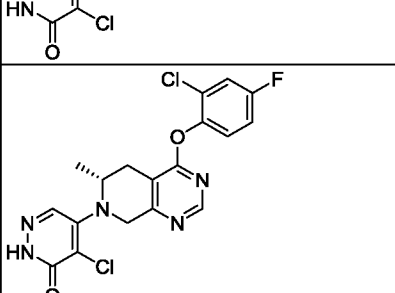
3. Сполука за п. 2, яка **відрізняється** тим, що, коли R<sup>1</sup> являє собою -CHF<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> не являє собою водень.

4. Сполука за п. 1, вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

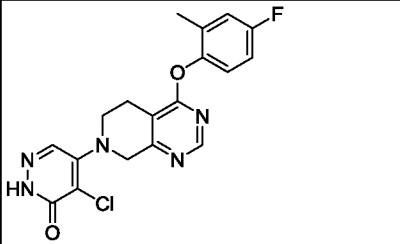
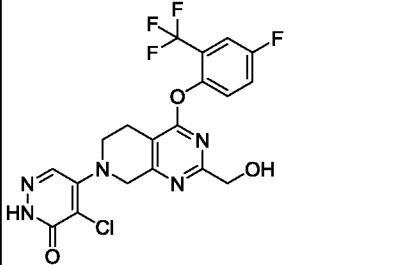
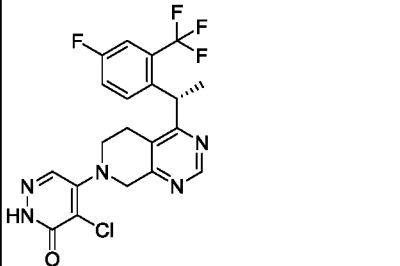
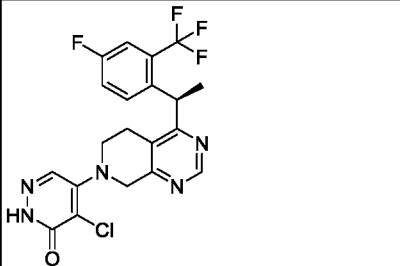
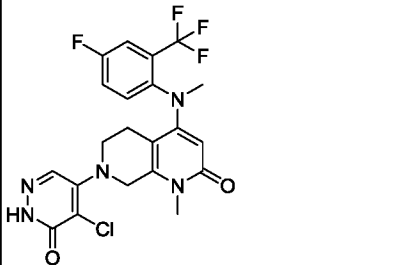
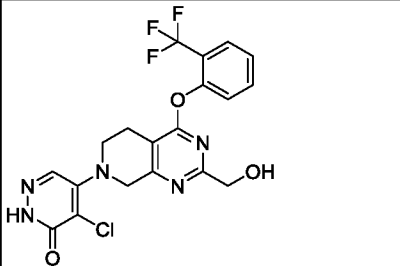
10

Сполука	Структура
100	
101	
102	
103	
104	

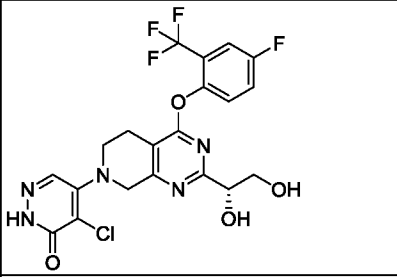
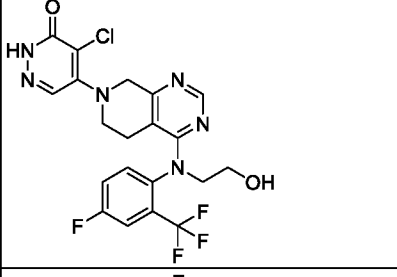
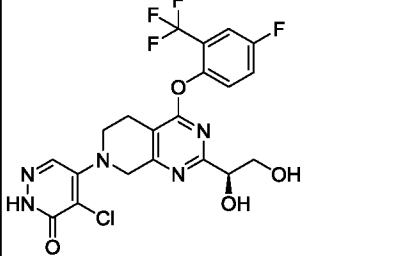
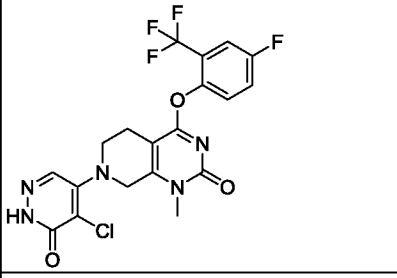
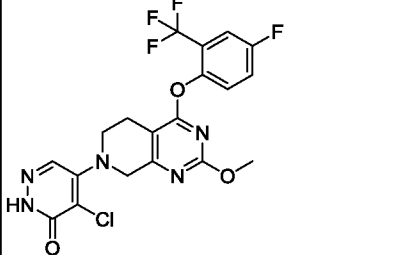
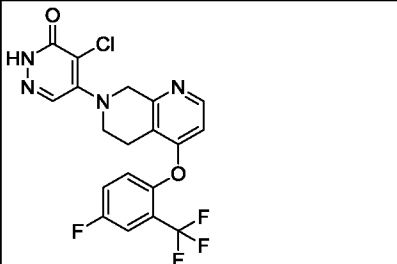
105	
106	
107	
108	
109	
110	

<p>111</p>	
<p>112</p>	
<p>113</p>	
<p>114</p>	
<p>115</p>	
<p>116</p>	
<p>117</p>	

117a	
118	
119	
120	
121	
122	
123	

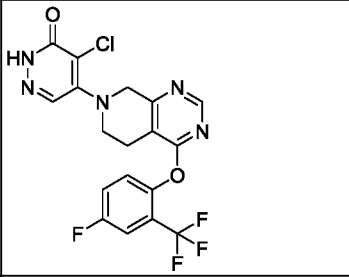
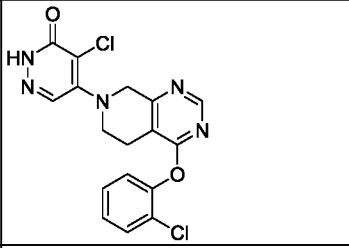
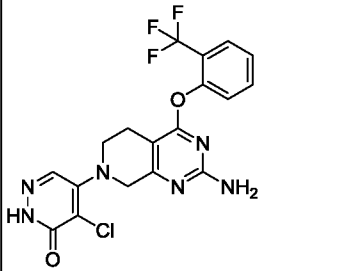
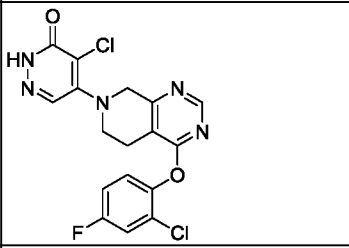
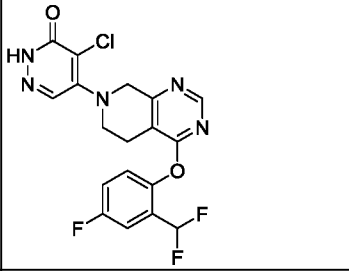
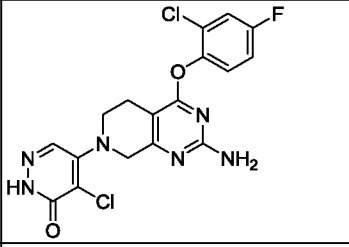
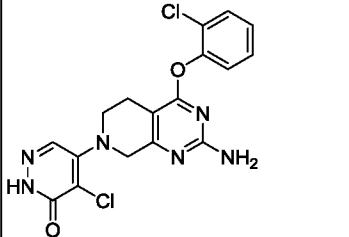
<p>124</p>	
<p>125</p>	
<p>126</p>	
<p>126a</p>	
<p>127</p>	
<p>128</p>	

129	
130	
131	
132	
133	
133a	
134	

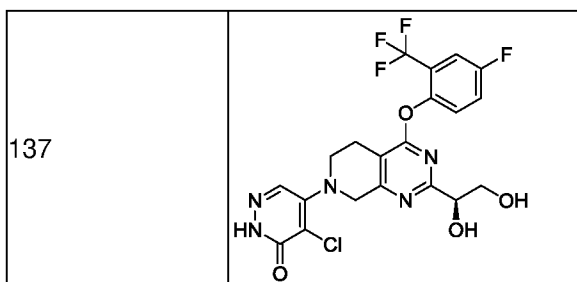
135	
136	
137	
138	
139	
140	

5. Сполука за п. 4, вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

Сполука	Структура
---------	-----------

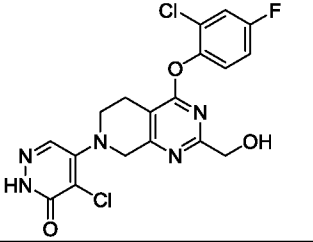
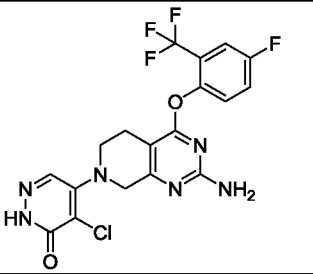
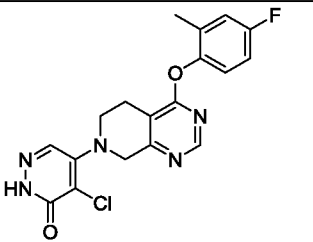
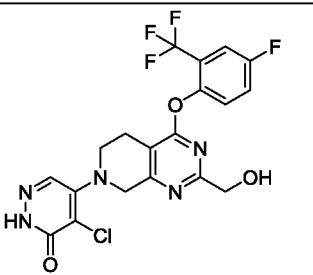
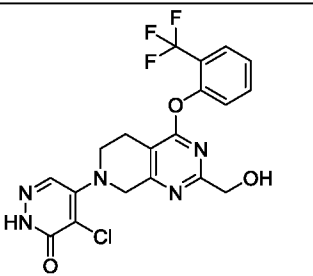
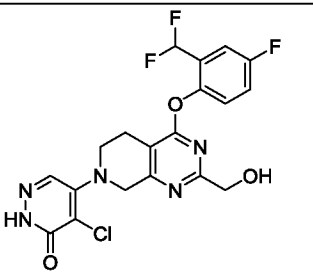
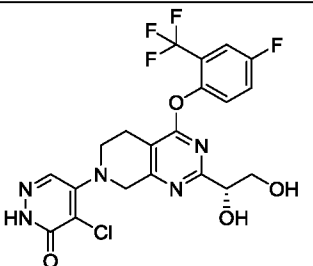
<p>100</p>	
<p>101</p>	
<p>102</p>	
<p>104</p>	
<p>105</p>	
<p>112</p>	
<p>113</p>	

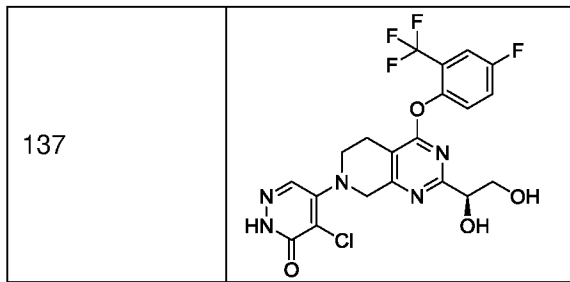
114	<chem>OCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)=C(Cl)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
116	<chem>NCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F=C(F)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
124	<chem>OCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)F=C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
125	<chem>OCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F=C(F)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
128	<chem>OCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F=C(F)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
134	<chem>OCC1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)F=C(F)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>
135	<chem>CC(O)C1=NC2=CC=C(C=C2N1)OC3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F=C(F)C3=CC(=O)NC=C3Cl</chem>



6. Сполука за п. 5, вибрана з будь-якої з наведених нижче сполук або її фармацевтично прийнятної солі:

Сполука	Структура
100	
101	
102	
104	
105	

<p>114</p>	
<p>116</p>	
<p>124</p>	
<p>125</p>	
<p>128</p>	
<p>134</p>	
<p>135</p>	



7. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким із пп. 1-6 і фармацевтично прийнятний носій.

8. Спосіб лікування або зниження ризику розвитку захворювання або стану, вибраного з захворювання нирок, легеневої артеріальної гіпертензії, занепокоєння, депресії, раку, діабетичної ретинопатії або болю, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-6 або фармацевтичної композиції за п. 7.

9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що захворювання або стан являє собою захворювання нирок, вибране з осередкового сегментарного гломерулосклерозу (FSGS - англ.: Focal Segmental Glomerulosclerosis), діабетичної нефропатії, синдрому Альпорта, гіпертонічної хвороби нирок, нефротичного синдрому, стероїд-резистентного нефротичного синдрому, хвороби з мінімальними змінами, мембранозної нефропатії, ідіопатичної мембранозної нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту (MPGN - membranoproliferative glomerulonephritis), MPGN, опосередкованого імунним комплексом, MPGN, опосередкованого комплементом, вовчакового нефриту, постінфекційного гломерулонефриту, захворювання тонкої базальної мембрани, мезангіального проліферативного гломерулонефриту, амілоїдозу (первинного), c1q-нефропатії, швидкопрогресуючого GN, анти-GBM захворювання, C3-гломерулонефриту, гіпертонічного нефросклерозу або IgA-нефропатії.

10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що захворювання нирок являє собою протеїнуричне захворювання нирок.

11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що захворювання нирок являє собою мікроальбумінурію або мікроальбумінуричне захворювання нирок.

12. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою легеневу артеріальну гіпертензію.

13. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що захворювання або стан, що підлягає лікуванню, являє собою біль, вибраний з невропатичного болю і вісцерального болю.

14. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що захворювання або стан являє собою рак, вибраний з хіміорезистентної карциноми молочної залози, адриаміцинорезистентного раку молочної залози, хіміорезистентного колоректального раку, медулобластоми і ангіогенезу пухлини.

15. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що захворювання або стан являє собою пов'язаний з трансплантатом FSGS, пов'язаний з трансплантатом нефротичний синдром, пов'язану з трансплантатом протеїнурію, холестатичну хворобу печінки, полікістоз нирок, аутомно-домінантну полікістозну хворобу нирок (ADPKD - autosomal dominant polycystic kidney disease), ожиріння, інсулінорезистентність, діабет II типу, предіабет, метаболічний синдром, неалкогольну жирову хворобу печінки (NAFLD - non-alcoholic fatty liver disease) або неалкогольний стеатогепатит (NASH - non-alcoholic steatohepatitis)

16. Спосіб за будь-яким із пп. 8-15, який **відрізняється** тим, що суб'єктом є людина.

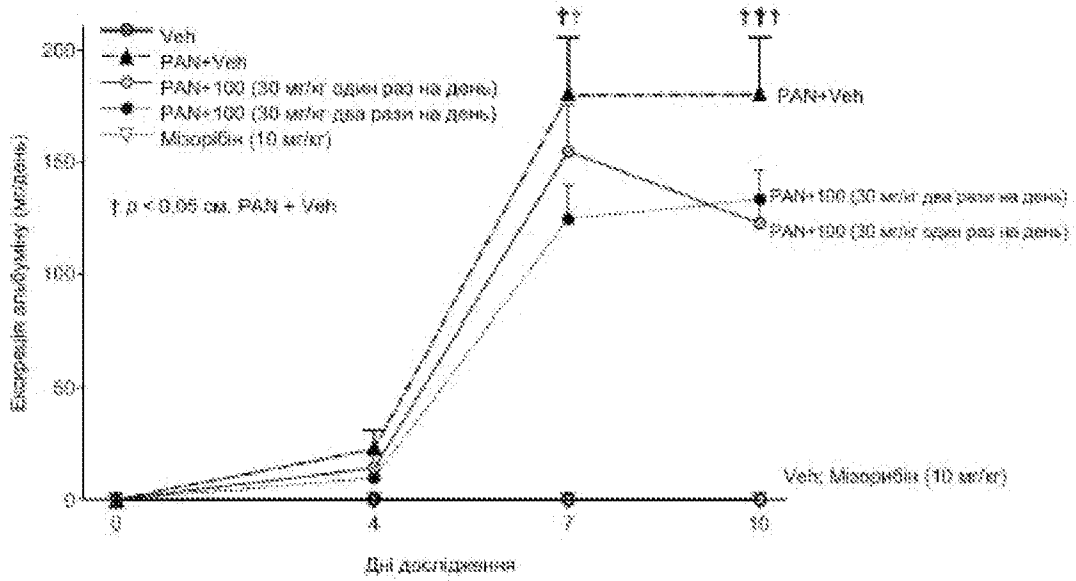


Fig. 1

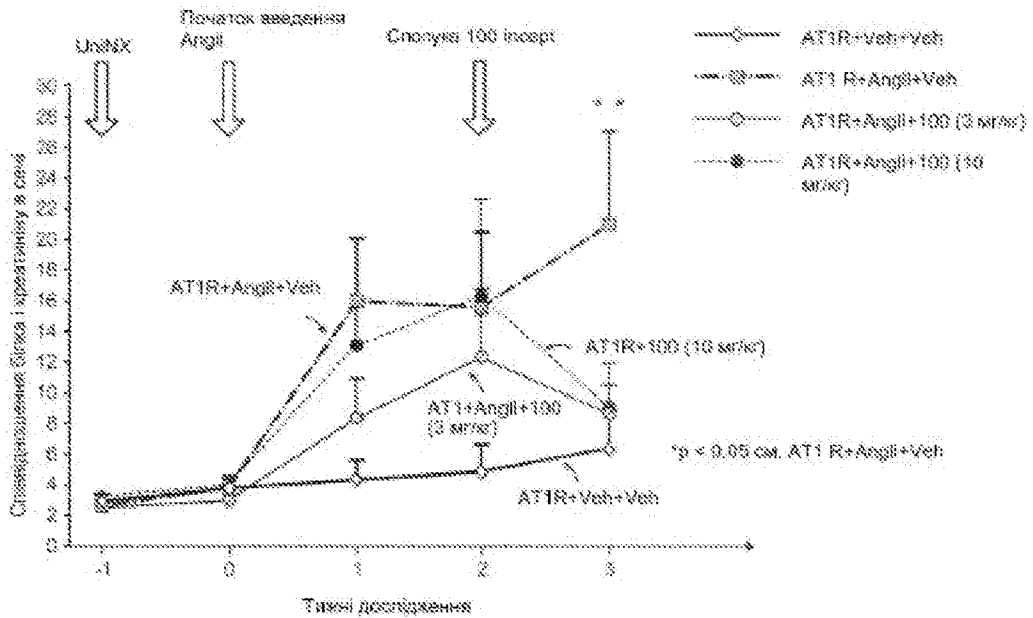
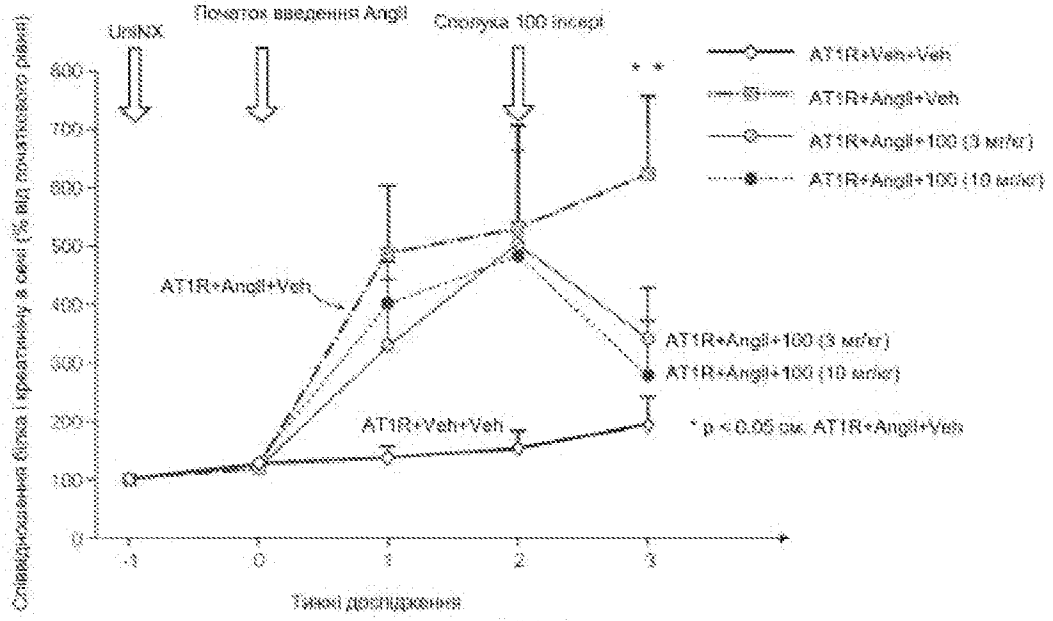


Fig. 2



Фиг. 3

ВЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GOLDFINCH BIO, INC.

<120> ПІРИДАСИНОНІИ ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> GFX-01125

<140> PCT/US2019/051680

<141> 2019-03-18

<150> 62/730,553

<151> 2018-12-17

<150> 62/732,728

<151> 2018-03-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8574

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний полінуклеотид

<400> 1

```

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtgcactct cagtacaact tcctctgatg      60
ccgcataagt aagccagtat ctgctccctg cttctgtgtt ggaggccgct gactagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca accaggcaag gottgacoga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggttag cggttttggc ctgcttcggg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaataaa ttacggggtc attagttcat agcccataa      300
tggagttcgg cgttacataa cttaaggtaa atggccggcc tggctgaccg cccaaagacc      360
ccggccatt gaggtcaata atgacgtatg tcccatagt aaagccaata gggacttttc      420
atggacgca atgggtggag taattacggt aactgccc cctggcagta catcaagtgt      480
atcatatgac aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgy taatggccc gcttggcatt      540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctaactggca gtacatctac gtattagtaa      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaataa tgggctggga tagcggtttg      660
aolcaagggg atttccaagt ctccacccc tggacgtaaa tgggagcttg ttttggcacc      720
aaaatcaag ggactttcaa aaatgtccta caaactccgc cccattgacg caaatggggg      780
gtaggcgctg acggtgggag gctatataaa gcagagctct cctatocagt gatagagatc      840

```

tccccatccag tgatagagat cgtccgacggag ctcgcttttagt gaacccgucag atccgcccggg 960  
 gacggccatcc accgctgctttt gaccccccata gaagacacccg gggacccgctcc agccctccggg 960  
 ctcctagcgtt taaaacctaaag cttgggtacccg agctccggctc ccgccaccatg gccccagctct 1020  
 accataaagag aaacccgcaat gccccttacc cccgacagcaat ccccctggaga atcgtgaggg 1080  
 cagagtcggg gctggagccca tccgagcaagg cctaccctgaa ccgcccgggag aaggggcyact 1140  
 atgcccagcgt gaagaagctc cgggagggag cccgagatcta ccttaaggatc aacatcaatt 1200  
 gcatccgactc tctggggcaga accgcccctgc tgatccgcat ccgagacccag aatctgggagc 1260  
 tggatccgggt gctgctggagc ttcacacgtgt atgtggggcga tggcccggctg caccgcccaca 1320  
 ggaaggaggtt ggtggggagca gttggagctgc tgcctgaatca caagaagccc agccggagaga 1380  
 agccaggtgac accctatcctg cttggacaaag agttctccgga gtttaccacca gatatacac 1440  
 cccatccatcc gggccgcccac accaaccaatt accgagatcac caagcctggctg gtcgagcaagg 1500  
 ggcctgtccgt gcccctggccc caccgaggtgc ggtgcaacty ccgtggagctgc gtcgagctcct 1560  
 ctgacgtggg ttcctctggag cacagccggg gcccggctgaa catctataag gcccctggccc 1620  
 ccccacatctt gatccgcccct agctccggagg accccctcctt gaccgcccctt cagctgtctt 1680  
 gggagccctca gggagctggag aaggtgggaga accgcttcaa gggccgagtac ggggagctgt 1740  
 ccagacagtg caagcagctc gcccaaggacc tgcctggatca gacacgctcc agcccgggagc 1800  
 tggagatcat cctgaaactt agggcaagata attctctgat ccgagggagcc agccggaaccg 1860  
 accctgggacc gctgcaaggct gccatcaagc accggccaggaa gggagctggg gccccagctca 1920  
 attgtccaggc gctgctggccc tcccgcctggt atgacagctt tccaggatgg ccgagcaaggc 1980  
 accggggcagt ggaagatgggt accctgctcca tccatggccc gctgctccccc gctgtccaggc 2040  
 tctgctaccct gatccgcccct aagctcccac tgggcccctgtt tatccgggag cctttccatca 2100  
 agtttatctg cccaccaccgc agctatctgca cactccctgtt tctgctggctg cttggcccctc 2160  
 agccaccatga ccgactctgat cttgaaacggc agggcccacc cccataccctc gctggagctgg 2220  
 tgatccctgac atggggctggct ggcctccatct gggggccgagat caagcagatg tgggacccggc 2280  
 gccctggccgga ctaccatccc gattgggtggg accctgatggg ttttctggatg aattcccctgt 2340  
 accctggcccac accctctctctg aagatccgtgg cctctccggaa gctatagccc cctgaaatccc 2400  
 gaggagctccct gggaccctggg caccctcacc tgggtggcaga gggcccctgtc gcaactcccca 2460  
 accatcttttc cctctctggcc cttgacccggc tgtttaccagg caatcccacc cttgggaccac 2520  
 tgcagatctcc cctggggaaccg atgctgctgg atatcccgaa gctcccctgctt atctactgac 2580  
 tgggtggctgct gggcccctggcc aaccggcccga atccgctgta cctctactat gaggaggaacc 2640

aggggocbtyac atgcaaggggc atccgocbtyg aqaagocagaa caatgoccttc agcaococbty 3700  
 tggagacact ggcagtctctg ttctggagoc tcttgygoc gatcaacocg taogtyacoc 2760  
 atgtgaaaggc ccagcaocagc tccacagagc ttgtggggoc caocactgttc ggcacacaca 3820  
 aagtgatctc ttctgggggct ctgctgaaca tgcctgatoc caatgatgac aatagctatc 2880  
 agctgatoc ccacacagcc gatctgagc ggaagcttgc ccggacacagc ctgtgagagc 2940  
 octactttga gggggggggc accctgocca caoctttcaa cgtgatocca tcccccagc 3000  
 ctctgtggta ttctgatcaag tggatcttggc caacocctgtg caagaagagc atgocgocggc 3060  
 agccctgagagc ctttgggcaoc atogggctgc gcaacacagoc cagaagggoc gacagacaaoc 3120  
 tggocgocga ccaocagctac caggagctga tggocacatc gctgagagcctc atgtgagcctg 3180  
 caatgatocg ggaocgcaagc aocgagggagc gaactgacagc ggcagcaactc aaggagctga 3240  
 agcagctatc cagctccttc agatcttggagc tgcctgggocct gctgaggggc agcaagctgt 3300  
 ccaocacoca gtcggoccaoc gctctcaagc agctctagca ttctgocgac agcagctgagc 3360  
 agagcagctc ccaggggcaoc tccaagggac agcaagagagc ctcagcctg tctgacocgac 3420  
 ccaacactgat ccaocacocg agcggocgca tggatocgca ggcggoccaoc atctcaactg 3480  
 gctctgocct gctggtgocg gagocacoca ggaagagagc gaggagagctg aactttgtgac 3540  
 cagctatoca gaactctggc ctgcttcaoc gaagggagcagc gacagcaagcc gcccagcagc 3600  
 aocgcaactc gatctctctc gctgagcagc agctgctgcaag ccaagcagggc gacagcacaoc 3660  
 tggagagggca tctccagcct gaggagcggg gaactggcagc cagggggagc ctgtccatoc 3720  
 caggacctgtc tggagcagctc gctgctggctg cccacagggc ggcgcaacoc gatacaactgg 3780  
 gactgcaact ggggcaagcct gctgctcctc tcaagagcagc gaagggctcctg gctgagggca 3840  
 cggctgoccat cactcccaag gaggagcagc ccaagggagc gctattcctct atocagctagc 3900  
 atctgcaact ggcagacacoc gctgacacagc agganctatgt gacacacagc ctgtgagcgg 3960  
 cggctctagc gggccocggctt caacocggctg atcagcctcct actgtgocctc ctactgtgca 4020  
 gcccactctgt gcttggocctc cccocgctgc tcccttgacoc ctggaagctg ccaactcocaoc 4080  
 tgtcccttc tcaataaactg aggcaactgc atocgactgt ctgagctagct gtcattctat 4140  
 tctggggggct ggggtggggc aggacagcaca ggggggagctc tggggaagcaca atagcagggc 4200  
 tgcctggggat ggggtgggct ctatggcttc tggggcggc agaacacagct ggggctctag 4260  
 ggggtatoc cagcggocct gtagcgggc attcaagcggc ggcggctgtgg tggctacggc 4320  
 cagcgtgacoc gctacaactg caagcggocct agcggocggct ccttcggctt tcttcocctc 4380

cttctctcggcc acggctccggcc gctttcccccgg tcaagctctta aatcggggggcc tccccttttagg 4440  
 gttcccgatatt agtctctcttca ggcacccctcga ccccaaaaaa ccttgatttagg gctgatgggttc 4500  
 acgttagctggg ccactcgcacct gatagacgggt ttttcgcacct ttgacgtttgg agtccacggtt 4560  
 cttcaaatagt tggactcttctg tccaaaactgg aacaaaacatc aacccctatcc cgggtctatcc 4620  
 ttttgacattt taaggggattt tgcctgacatc ggcctatctgg tcaaaaaaatg agctgacattt 4680  
 acaaaaaattc aacgcgcaatt aatctctgtgg aatctgtctgc agtttaggggtg ttggaagaattc 4740  
 ccaggctctcc cagccagggcag aagtatctgca aagcctgcctc tcaacttagtc agtcaaccagg 4800  
 tcttggcaaat ccccaggctc cccagccaggc agcaagtatctc aagccatgca totcaattag 4860  
 tcaagcaaac aagctcccgcc cctaaactcgg cccactcccgcc cctcaactcc gcccaggtccc 4920  
 gcccactctcc cggcccactgg ctagactaatt ttttttaatt atgcagaggcc cgaaggccggcc 4980  
 tctgcccctcc agctatctcca gaaagttagtga ggaaggccctt cctggaggccct aggtctttctgc 5040  
 aaaaagctcc cggggagcttg tatatccaat ttccgatctg atcagccact gatgaaaaag 5100  
 cctgaaactca cccggacgctc tctctgagaag tttctgatccg aaaaagttcga cagcgtctccc 5160  
 gaaacctgact agctctctcggc gggccgaaagaa tctcgtgctt caagctctga tcttagggggg 5220  
 cgtgggatact tcccctcgggt aaaaatagctgc cccctgctgctt tctacaaga tctcttactct 5280  
 tactcggcact tctgcaatcggc cggcgtccccc attccgggaaag tctctgcaact tgggggcaattc 5340  
 agccgagagcc tgaacctattg cactctccccc cgtctcacagg gctgtcaagtt gcaagacacct 5400  
 cctgaaaaccc aactgcccggc tctctctgagc cccggtccgggg agggccactgga tctcgtatcgt 5460  
 gcccggccgact tttagccagac gaaagggggttc gggcccactcc gacccgcaagg aatccggctca 5520  
 taaacctaacat ggcctgtgatt cactatgcccg attgctgctat cccactgctga tcaactggca 5580  
 aactgtgactgg accgacacccgt caggtgctctc gttccggccagg cttctcgtatga gctgcatctt 5640  
 tggggccgagg aactgcccga agtcccggcc cctcgtgcaag ccggaattccgg cttcaaacat 5700  
 gttcctgacgg accaatggccg cactaacagcg gttcattgact gggagccaggc gatggttcggg 5760  
 gatcccccact accgaggtcgc caaacatcttc tctctggaggcc cgtggtttggc ttgtatggag 5820  
 cagccagacgc gctactctga cgggaggccat cccgagctctg caggatccgc gggcctccgg 5880  
 gcttatctagc tccgcaatggg tctctgacaa cctctatcaga gcttgggttga cggcaatttc 5940  
 gatgatgtag cttggggccga ggggtcagatc gaccccaatcg tccgactccgg agccggggact 6000  
 gttccggctga ccaaaaatgc cccgagaaagc gggcccgctct ggaaccgactgg ctgtgttaga 6060  
 gtaactcggcc atagctggaaa cccgacgccc agcactcgtc ccaggggcaaa gyaatatgac 6120  
 gttcccaagag atttcgattc caaccgccc tctctatgaaa ggttgggctc cggcaatcgtt 6180

ttccgggggag	ccgggctgggat	gactccctccag	cgccgggggagtc	tcactggctggga	gttccttcggcc	6240
cacccccaact	tgctttatctgc	agctttataaat	ggcttaccaaat	caagcccaatag	catccacaaat	6300
ttcacaaaata	aagccatctct	ttcaactgcaat	tctagcttctg	gtcttgctccaa	actccatcaat	6360
gtatccttata	actgctctgtat	accgctcgaaac	tctagcttaga	gcttcggcgtta	atccatggctca	6420
tagctgtcttc	ctgctgtgaaa	ttgcttatccg	ctcaccaattc	caacacaaat	accgagccggga	6480
agcataaaagt	gtaaaagccctg	gggtgcccata	tgagctgagct	aaactcaaat	aaattgctgtg	6540
cgctccactgc	ccgctctccca	gtccgggaaaa	ctgctcgtgac	agctcgcaat	atgcaatcggc	6600
caaacgctggg	ggagagggggg	tttgctgtat	ggggcgctctt	ccgctctcttc	gctccactggac	6660
ccgctctgct	ccgctctgctg	gctcggcggcga	gctgctatccag	ctccactccaaa	ggcgggtaaa	6720
ccgctctatca	cagcaatcagg	ggatatacgc	ggcaagcaaca	tgctgagcaaa	agggccagcaca	6780
aaaggccaggg	accgtaaaaa	ggccgctgttg	ctggcgtctct	cccataggct	ccgccccct	6840
gcgcagcctac	cccaaaaatcc	accgctcaagt	cagaggtgggc	gcaacccgac	aggactataa	6900
agataccaggg	cgctctccccc	tggaagctcc	ctcgtcgggc	ctccctgtctc	gacccctggcc	6960
cttaaccggat	accctgctcgc	ctctctccct	ccgggaaagcg	ggcggctctc	ccataggctca	7020
ggctcttaggt	actctcagctc	ggctctaggtc	gttcgctccca	agctgggctg	tgctgcaaggaa	7080
ccccccgctc	agccccgagcc	ctgctcctta	tcgggtcaat	atgctcttga	gtcccaaccg	7140
gtaagacacag	acttatccgc	actggcagca	gcccactggta	caagcactag	cagcagcaggg	7200
tatgtaggccg	gtgctacaga	gttccttgaa	tggtggcctta	actacggcta	caactagaaga	7260
acagctactct	gtatccgggc	ctgctgcaag	ccagctcaact	ccggcaaaaag	agctggctagc	7320
tcttgatccg	gcaaaccaaac	ccccgctggct	agcggctggct	tttttggcttg	caagcagcag	7380
actacggcga	gaaaaaaaagg	atctcaaggaa	gactccttga	tcctctctac	ggggctctgac	7440
gctcagctgga	acgaaaaactc	acgttaagggg	ctcttgctca	tgagatctac	caaaaaggatc	7500
ttcaactaga	tccttttcaa	ttaaaaatga	agtttttaat	caatctaaa	tatatatgag	7560
taaccttggg	ctgacagcta	ccactgctta	atcagctgagg	caactatctc	agcagatctgt	7620
ctactctcgt	catccatagt	tgctctgactc	cccgctcgtg	agataactac	gatacgggag	7680
ggcttaaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccggagg	accacagctc	accggctccca	7740
gatttatccg	caataaaaac	gcccagccggc	agggccggagc	gcagcaagtgg	tcctgcaaac	7800
ctatccggct	ccatccagtc	tattaatctg	tgccggggaa	ctagagctaa	tagcttggcca	7860
gttaaatagct	tgccgcaagct	tgctgcaact	gctacagga	ctgctggctgc	accgctcgtc	7920

```

tttgggtatgg ctccattcag ctccgggtcc caacgatcaa gggcaggtac atgatcccc 7980
atgttgggtca aaaaagcgggt tagctccttc ggtctctccga tcyttgtcag aagtaagttg 8040
gcccgcagttt tatcaactcat ggttanngca gcaactgcata attctctac tgtcatgcca 8100
tccgtaagat gctttttcgt gactggtgag taactcaaca agtcattctg agaatagtgt 8160
atggcgccgac cgagtttctc ttgcccggcg tcaataccggg ataataccgc gccacatagc 8220
agaactttca aagtgtctat cattggaaaa cgttctctgg ggcgaaaact ctcaaggacc 8280
ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcggg cacccacatg atcttcagca 8340
tctttcaact tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaaacg gaaggcaaaa tgcgcgcaaaa 8400
aagggcaata gggcgacccg gaatatgtga atactcaac tcttctttt tcaatatcat 8460
tgaagcattt atcagcgtta ttgtctcatg agcggataca tatttgcatt tatttagaaa 8520
kataaacaaa taggggttcc ggcacatctt ccccgaaaag tgcacactga cgtc 8574

```

- <210> 2
- <211> 8541
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність

- <220>
- <223> Опис штучної послідовності: Симпатичний полінукліотид

```

<400> 2
gacggatccg gagatctccc gatccctat ggtgcactct cagtaacaatc tgcctctgatg 50
ccgcatacgtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggtt gggggctcgtt gagtagtggc 100
cgagcaaaaat ttaagctaca accaaggcaag gcttgaccga caattgcattg aagaatctgc 150
ttaggggttag gggttttggc ctgctccggg atgtacgggc cagatataag cgttgcacat 200
gattattgac taqttatcaa tagtaatcaa ttacggggctc attagtctat agcccatata 300
tggagtctcc cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccc cccaaagacc 350
cccgcaccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcacaata gggactttcc 400
attgacgtca atgggtggag tatttaagct aaactgcacc cttggcagta catcaagtgt 450
atcatatgcc aagtaaccgc cctattgagc tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 500
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtatttagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tggggcgtgga tagcggtttg 650
actcaagggg atttccaagt ctccaccoca ttgacgtcaa tgggagtttg tttggccacc 700
aaaaacaag ggaacttcca aaatgtcgtc acaactccgc cccattgacg caaatggggc 750

```

gttagggctgtt acgggtggggag gttccatataa gtcaggagctct cccatascagt gataggagatc 840  
 tccccatcagc tgatagagagat cgtcgaacagc ctccgtttcagt gaaccctcagc atccgctcggc 900  
 gaaagccaaacc accctgttttt gaccctccata gaaggacaccg ggaaccgatac agcctccggca 960  
 ctctaggctgt taaaactcaag cccaagctcgg ctagaccctcc atgggcccaac tgtactacaa 1020  
 aaaggtccaac tactccaccgt acagagaccgc catccccctg caaatctgca gggctcggagc 1080  
 agagctctct gtcagagggaga aggcctctccc caatgctctg gagaagggggc actatgccc 1140  
 tgtgaagcagc gcccctccagc aggcctcagat ctactataat gttaaactca actgcatggc 1200  
 cccctcgggc cggagctgccc tgcctcattgc cattgagaaac gagaaccctgc agatcattgc 1260  
 gctactgctg kaaccacagcc tgtatctggg tgatgctatt ctctatggca tacgccaggc 1320  
 agtggctgggc gctgtggagc ttctgctcag ctacagggcgc cccaggggag agaacgagct 1380  
 ccccacctctc atgatggaca cgcagttctc tgaattcaca cgggacatac ctcccatac 1440  
 gctggctgcc caaaccaaca actaagaaat catcaaaatg cttgtccaaa aacgggtcac 1500  
 tctcccagc ccccaccaga tccgctgcaa ctgtgtggag tgtgtgctca gttcagagct 1560  
 agaacagctc cgcacctctc gctcccagc gaacctctat aaggctctgg caagcccctc 1620  
 actcattgcc ttatcaagtc aggaaccacc cctaacctgc ttccgtctgg gctgggagct 1680  
 caaggagctc agcaaggttc agaatgagtt caagggccagc tatgaggagc totctcagca 1740  
 gtgcaagctc tttgccaagc accctgctgca ccaagctcggc agctccaggg caactggagc 1800  
 cctccctcac cctggagatc accacagtga agagcttgac cctcagagct accatgacct 1860  
 ggcacaagctc aggttggcaa tcaaatccca ccagaaagag ttgtttgctc agcccacctc 1920  
 caaacagctc cttgccaacc tgtggctatga tggcttccc cggatgggggc ggaaccactc 1980  
 ggttagtccag cctctaacct gcctgaccat cgggttccctc ttcccactgc tctctatagc 2040  
 ctactgatac tcacccagga gcaaccctgg gctgtccatc aagaaaacct ttatcaagct 2100  
 tatctgcccac acagcactcc atttgacctc cctctttcag cttctcttgg cttctcagca 2160  
 cactgtccagc acagaccctc atgtacaggg gcccctcccca actgtcctgg caatggatgat 2220  
 actgctctgg gttctagctt tcatttgggg tgagatcaag gaactgtggc atggtggatc 2280  
 tactgaatac atccatgact ggtgggaacc gatggatctt gcaactgaaac cccctctacc 2340  
 ggcacaactat tcccagaaqa ttgtggctca tgtcaagtat caatggctctc gttcaagggc 2400  
 ggaatgggaa atgttggacc cgaactctgat tggggaaagca ctctctgcaa tatccaacat 2460  
 tttcaagttcg ttgctctctca tatccctgct cacagcccaac tcccacttag gaacctctgca 2520  
 gatctctctc ggaagcactgc tgcctgatat cctcaaatcc ctcttctctc actgctcggc 2580

actactagct ttgccaatg gaactgaaca gctttacttc tattatgaaa ccagagctat 3640

cgatgagcct aacaaactga aggggacccg atgtgagaaa caggaaacatg ccttctccac 3700

gaccccttgag aaccttcaat caacctcttc gacctgtatt ggcaccttaa atctatattg 3760

ccccaatgct aaggccagac aogaaatcac caggtttgta gtagctacca tgttttggac 3820

atacaactgt atctccctgg tagtgctgct gaacacgctg actgctatga tgaacaacct 3880

ctatcagcct atgcccagtc atgctgatat caggtgggag ttgcaaggga cgaagctctg 3940

gatgagctta cctgagagag gttggcaccct gccacacctt tcaaacatca tcccaagccc 3990

caagctcatt cctaacacct gacaaatgggt caaacacacc tctctgcccc aagagagacc 3960

tgaacggtaga cggagagaggg gcaaccttgag aagattcaca gaacggcaatg ctgacagcct 3120

gatacaaaaa caaaccttat agggaaattat caggaaattta gtcaaaagat atgtggctgc 3180

tatgatcaaga aattccaaaa caactgagggg acttaccagaa gaacaaattta aggaattaaa 3240

gcaagacacc tccagctccc ggtacagagct gcttggacct tgggaaaaaa gaacaaacct 3300

aagggagctt tccactagca gcaactgaaat gtcctcagaga gaagatata atgatggcag 3360

tggtaggggct cgggcccacat ccaagagctgt cctcttcaat ttaggctgca agaaaaagac 3420

ttgcaatggg ccacctctca tcaagaaacc gccaaagctc agtgggtgccc aaggaaagctc 3480

aaaagctgag tcaacaaaga aagctcctt cactgggtct tctctcaaga aactgggtct 3540

octattctcc aatttcaatg gtcatactgc tgaacccagt tcaagagcaa tgtacacaat 3600

tctcagatgga atgtttcagc agcaactgtat gttggcagga acacagatatt ctacagatgga 3660

gaaaggggaaa gcaagagcct gttctcaaaag tgaacataac ctcaagtggg tagaattagg 3720

tgaagctccag ggcctctgct agagcagctga atgccccca gctctgtcca gctctctcca 3780

ctgtgcaacc agcatctgct cctcaaatcc caaaccttta gaacctcag aggagctatt 3840

tgaacacctg gtagagagct gtagacctgct cctgcaaaaa tggggctgag gacaggaaga 3900

acaagttaca actogcctc aatgactoga gtcctagaggg ccctgtttaa ccctctgact 3960

agccctcgaat gttgctctca gttgcccagc atctgtttgt tggccccccc ccgagccttc 4020

cttgaacctg gaaggtgcca ccccaactgt cctttctcaa caaacatgag aatttgcctc 4080

gcattgtctg agtagctgtc attctattct ggggggtggg gttggggcagg acagcaaggg 4140

ggaggatctg gaagacaata gcaagcactg tgggagctgg gttgggtcta tggcctctga 4200

ggcgggaaaga accagctggg gctctagggg gctatccccg ggcctctgta ggcggcctat 4260

aagcgggggg ggtgtgggtg tcaagcagag cgtgcaagct caacctgcca ggcacctaga 4320

gggggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg 4380  
 aggggggggggg cgggggggggg cttggggggggg cgggggggggg gttggggggggg gttggggggggg 4440  
 oooooooooo gggggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg 4500  
 cggggggggggg agggggggggg cgggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg 4560  
 gggggggggggg cgggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ttggggggggg 4620  
 gttggggggggg ggggggggggg ttggggggggg ttggggggggg ggggggggggg ttggggggggg 4680  
 gttggggggggg ttggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ttggggggggg 4740  
 ttggggggggg ttggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg 4800  
 gttggggggggg gttgggggggg ttggggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg 4860  
 gttggggggggg ggggggggggg ttggggggggg gttgggggggg ttggggggggg ggggggggggg 4920  
 gttggggggggg ggggggggggg ggggggggggg gttgggggggg ttggggggggg ggggggggggg 4980  
 gttggggggggg ggggggggggg gttgggggggg ggggggggggg ggggggggggg gttgggggggg 5040  
 gttggggggggg gttgggggggg ggggggggggg ggggggggggg ggggggggggg gttgggggggg 5100  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5160  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5220  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5280  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5340  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5400  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5460  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5520  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5580  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5640  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5700  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5760  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5820  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5880  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 5940  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 6000  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 6060  
 gttggggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg gttgggggggg 6120

tatgaaaggt tgggottcgg aatogtttto cyggaacycgg gctggatgat cctccagcgc 6180  
 ggggatotca tgcctggagt ctccggccac cccaaacttgt ttattgcagc ttataatggc 6240  
 tacaaataaa gcaaatagcat cacaaattto acaaaataag cattttttto actgcattct 6300  
 agttgtggct tgcocaaaact catcaatgta tcttatcagc tccgtatacc gtcgacccct 6360  
 agctagagct tggcctaacc atggtccatag ctgttttcctg tgcgaaatcg ttatccgcctc 6420  
 acaactccac acaacataag agccgggaagc ataaagtgta aagccctgggg tgcctaatga 6480  
 gtcgacctaac tcaacataat tgccttgcgc tcaactgcocg ctttccagtc gggaaaacctg 6540  
 tccctgcagc tgcattaatg aatccggcca cgcgggggga gaggcggctt gcttattggg 6600  
 cgcacctcag cttccctcgc cacggactcg ctgagctcgg tgcctccggc ggggagagcg 6660  
 gttatcagctc aaccaaaaggc ggttaatacgg ttatccacag aatccaggga taacgcagga 6720  
 aagaacatgt gaggcaaaag ccagcaaaag gccagggaac gtaaaaaggc cgcgcttgcctg 6780  
 gggcttttcc ataggctccg ccccccctgac gaggcatcac aaaaacgacg ctcaagtcag 6840  
 aggtggcgaa acccgacagc actataaaga taaccaggct ttccccctgg aagctccctc 6900  
 gtcgctctcc cggctccgac cctgcctcgc accggtatcc tgcctccctc tccccctcag 6960  
 ggaagcgtgg cgcctttctca tagctccagc tcttaggtatc tcaagtccgct gtaggtcgtt 7020  
 cgcctccaggc tgggctgtgt gcaagcaacc cccgtccagc ccgacccctg cgccttatcc 7080  
 ggtaaactatc gctctgagtc caaaccggta agaacccagc tatcccaact ggcagcagcc 7140  
 actggtaaca ggtattagcag agcggaggtat gtagggcgtg ctacagagtt cttgaaagtgg 7200  
 tggcctaaat accgctaac ctagaaagacc gttattggta tccgcctctc gctgaaagcc 7260  
 gttacctcag gaaaaagagt tggtagctct tgcctccgca aacaaaccac cgcctggtagc 7320  
 ggttggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt ccgctccagaa aaaaaggatc tcaagaagat 7380  
 cctttgatct tctctacggg gctcgaagct cagtggaaag aaaaactcag ttaagggatc 7440  
 ttggcctga gattatcaa aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaaatgagc 7500  
 tttaaatcaa tctaaagtac atatgagtaa acctggctcg ccagttacca atgcttaato 7560  
 agtcaggcac ctatctcagc gatctgtcta ttccgtctat ccatagttgc ctgactcccc 7620  
 gtcgcttaga taactccgat ccggggagggc ttaccctctg gccccagtcg tgcactgata 7680  
 cggcgagacc cagcctcac ccctccagat ttatccgca taaaccagcc agccggaggg 7740  
 gccggagcga gaagctggctc tgcacattta cccgcctcca tccagcttat taattgttgc 7800  
 cyggaagcta gaggaaagtag ctccgcagtt aatagtttgc gcaacgctgt tgcactcgtc 7860

```

acaggeatcg tgggtgtoacg ctogtggctt ggtatggott cattcagctc eggttecoaa 7920
cgatocaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctccctcggg 7980
ctccogatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtggtat cactcactggc tatggcagca 8040
ctgcataact ctcttaactgt catgcaatcc gtaagatgct tctctgtgac tggtgagtac 8100
tcaacccaagt cactctgaga atagtgtatg cggcgaccca gttgctcttg ccggggctca 8160
atacgggata atacggggcc acatagcaga actttaaaag tgcctcatcat tggaaaaagt 8220
tcttgggggg gaaaaactctc aaggatotta ccgctgctga gatccagttc gatgtaacc 8280
actcgtgcaac ccaactgato ttcagcator ttaactttca ccagcgttcc tgggtgagca 8340
aaaaacaggaa ggcassaatgc cgcassaaaag ggaataaggg cgacaaggaa atgttgata 8400
ctcactactct tcccttttca atattattga agcatttato agggttattg tcccatgagc 8460
ggatacatat ttgaaatgat ttgaaaaaat aaacaaatag gggttccgog cacatttccc 8520
cgaaaagtgc cacttgact c 8541

```