

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036668

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.07

(51) Int. Cl. C07D 403/04 (2006.01)
C07D 417/04 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)

(21) Номер заявки
201991488

(22) Дата подачи заявки
2018.01.23

(54) МОДУЛЯТОРЫ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

(31) 62/449,270

(56) WO-A1-2006100212
SHARAN K. BAGAL ET AL.: "Ion
Channels as Therapeutic Targets: A Drug
Discovery Perspective", JOURNAL OF MEDICINAL
CHEMISTRY, vol. 56, no. 3, 14 February 2013
(2013-02-14), pages 593-624, XP0055245230, ISSN:
0022-2623, DOI: 10.1021/jm3011433 figure 28;
compound 65
WO-A1-2017210545

(32) 2017.01.23

(33) US

(43) 2019.12.30

(86) PCT/US2018/014792

(87) WO 2018/136917 2018.07.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАДЕНТ ТЕРАПЕУТИКС, ИНК. (US)

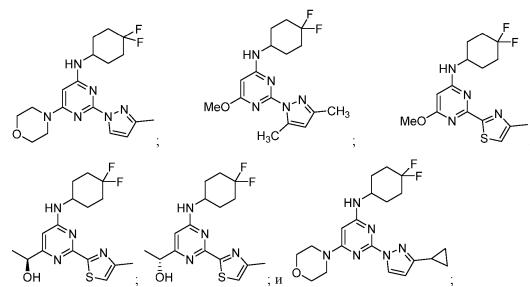
(72) Изобретатель:

Амруткар Дипак Васантрао (DK),
Фостер Келли (US), Якобсен Томас
Амос (DK), Джейфсон Мартин Р., Кеани
Грегг Ф. (US), Ларсен Янус Шрайбер,
Нильсен Карин Сандагер (DK)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Парамонова К.В.,
Христофоров А.А., Глухарёва А.О.,
Лебедев В.В. (RU)

(57) Предложены соединения следующих формул:



и их фармацевтически приемлемые соли, полезные для лечения различных заболеваний, расстройств или состояний, связанных с калиевыми каналами.

B1

036668

036668
B1

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/449270, поданной 23 января 2017 г., полное содержание которой тем самым включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Уровень техники

Среди ионных каналов калиевые каналы являются наиболее распространенными и разнообразными и присутствуют в различных клетках животных, таких как клетки нервной, мышечной, железистой, иммунной, репродуктивной и эпителиальной ткани. Эти каналы обеспечивают поток калия в клетку и/или из клетки при определенных условиях. Эти каналы регулируются, например, чувствительностью к кальцию, потенциал-чувствительностью, вторичными мессенджерами, внеклеточными лигандами и АТФ-чувствительностью.

Известно, что дисфункция калиевых каналов и дисфункция других процессов, влияющих на калиевые каналы, вызывают потерю клеточного контроля, изменение физиологической функции и болезненные состояния. Из-за способности модулировать функцию ионного канала и/или восстанавливать активность ионного канала модуляторы калиевого канала используются в фармакологическом лечении широкого спектра патологических заболеваний и имеют потенциал для применения при лечении еще более широкого круга терапевтических показаний.

Кальций-зависимые (кальций-активируемые) калиевые каналы малой проводимости (канал SK) являются подсемейством Ca^{2+} -зависимых K^+ каналов, и семейство каналов SK содержит 4 члена - SK1, SK2, SK3 и SK4 (часто называемые каналами средней проводимости). Физиологическая роль каналов SK была особенно хорошо изучена для нервной системы, где, например, они являются ключевыми регуляторами возбудимости нейронов и высвобождения нейротрансмиттеров, и для гладких мышц, где они являются крайне важными для модуляции тонуса мускулатуры сосудов, бронхов и трахеи, уретры, матки или желудочно-кишечного тракта.

Учитывая указанные положения, низкомолекулярные модуляторы калиевых ионных каналов могут иметь потенциал для лечения большого количества заболеваний, характеризующихся дисфункцией калиевых ионных каналов и дисфункцией других процессов, влияющих на калиевые каналы.

Сущность изобретения

Раскрыты соединения и их фармацевтически приемлемые соли и их фармацевтические композиции, являющиеся полезными при лечении заболеваний, связанных с дисфункцией калиевых ионных каналов и дисфункцией других процессов, влияющих на калиевые каналы (см., например, табл. 1).

Было обнаружено, что соединения, описанные в настоящем изобретении, обладают одним или более из следующих благоприятных свойств: хорошая растворимость, высокая свободная фракция в головном мозге, незначительное ингибирование hERG или его отсутствие, продолжительный период полувыведения *in vivo*, хорошая биодоступность, высокая стабильность в микросомах печени, повышенная проницаемость, такая как проницаемость, измеренная с помощью анализа проницаемости через параллельные искусственные мембранны (parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA) и/или низкое ингибирование CYP. См., например, сравнительные данные в табл. 2 и 3.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой диаграмму, показывающую эффект соединения 1 после перорального введения (peroral, PO) на индуцированный гармалином трепор;

фиг. 2 показывает эффективность и дозозависимый эффект соединения 1 в процентах мощности движения;

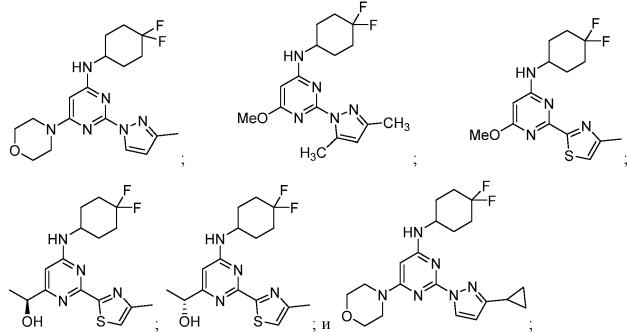
фиг. 3 показывает эффекты соединения 1 на нерегулярность возбуждения клеток Пуркинье в срезах *ex vivo* от трансгенных мышей SCA2 58Q;

фиг. 4 показывает эффекты соединения 1 на исходную атаксию в мышиной модели Tottering EA2.

Подробное описание изобретения

1. Соединения.

В настоящем изобретении предложены соединения следующей формулы:



или их фармацевтически приемлемые соли.

2. Определения.

Используемые в настоящем изобретении термины "субъект" и "пациент" могут использоваться взаимозаменяющими и означают млекопитающее, нуждающееся в лечении, например домашние животные (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственные животные (например, коровы, свиньи, лошади, овцы, козы и т.п.) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и т.п.). Как правило, субъектом является человек, нуждающийся в лечении. В случае, когда стереохимия раскрытое в настоящем изобретении соединения названа или изображена в виде структуры, названный или изображенный стереоизомер имеет чистоту по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 99 или 99,9% по массе относительно всех других стереоизомеров. Чистота в процентах по массе по отношению ко всем другим стереоизомерам представляет собой отношение массы одного стереоизомера к массе других стереоизомеров. В случае, когда один энантиомер назван или изображён в виде структуры, изображённый или названный энантиомер имеет оптическую чистоту по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 99 или 99,9 мас.%. Оптическая чистота в процентах по массе представляет собой отношение массы энантиомера к сумме массы энантиомера и массы его оптического изомера.

В случае, когда раскрытое в настоящем изобретении соединение названо или изображено в виде структуры без указания стереохимии, и соединение имеет один хиральный центр, следует понимать, что название или структура включает один энантиомер соединения, свободный от соответствующего оптического и геометрического изомера, рацемическую смесь указанного соединения и смеси, обогащенные одним энантиомером относительно его соответствующего оптического изомера. Фармацевтически приемлемые соли, а также нейтральные формы соединений, описанных в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение. Для использования в лекарственных средствах соли соединений относятся к нетоксичным "фармацевтически приемлемым солям". Фармацевтически приемлемые солевые формы включают фармацевтически приемлемые кислотные/анионные или основные/катионные соли. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают соли натрия, калия, кальция, магния, диэтаноламина, N-метил-D-глюкамина, L-лизина, L-аргинина, аммония, этаноламина, пиперазина и триэтаноламина. Фармацевтически приемлемые кислотные/анионные соли включают, например, ацетат, бензольсульфонат, бензоат, гидрокарбонат, гидротартрат, карбонат, цитрат, дигидрохлорид, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, гексилрезорцинат, гидробромид, гидрохлорид, малат, малеат, малонат, мезилат, нитрат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат и тозилат. Термин "фармацевтически приемлемые носитель, вспомогательное вещество или основа" относится к нетоксичному носителю, вспомогательному веществу или основе, которые не подавляют фармакологическую активность соединения, с которым они находятся в составе. Фармацевтически приемлемые носители, вспомогательное вещества или носители, которые могут быть использованы в описанных в настоящем изобретении композициях, включают, но не ограничиваются ими, ионообменные материалы, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки крови, такие как альбумин человеческой сыворотки, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси частичных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трициликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и шерстяной воск. Термины "лечение", "лечить" и "лечащий" относятся к обращению, облегчению, уменьшению вероятности развития или подавлению развития заболевания или расстройства или одного или более их симптомов, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лечение может вводиться после развития одного или более симптомов, что означает терапевтическое лечение. В других вариантах осуществления настоящего изобретения лечение может вводиться при отсутствии симптомов. Например, лечение может вводиться предрасположенному индивидууму до появления симптомов (например, в свете истории симптомов и/или в свете генетических или других факторов предрасположенности), что означает профилактическое лечение. Лечение также может быть продолжено после устранения симптомов, например, для предотвращения или отсрочки их рецидива.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" включает количество соединения, описанного в настоящем изобретении, которое вызывает биологический или медицинский ответ у субъекта.

3. Применение, состав и введение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, являются полезными при лечении заболеваний и/или расстройств, связанных с активностью калиевых каналов. Указанные заболевания и/или расстройства включают, например, нейродегенеративные и неврологические состояния (например, болезнь Паркинсона, трепор, болезнь Альцгеймера, деменция, боковой амиотрофический склероз (БАС), атаксия, тревожность, депрессия, расстройства настроения, дефицит памяти и внимания, биполярное расстройство, психоз, шизофрения, черепно-мозговая травма и нарколепсия), заболевания сердца и связанные с ними состояния (например, ишемическая болезнь сердца, коронарная болезнь сердца, стенокардия и спазмы коронарных артерий),

метаболические заболевания и заболевания мочевого пузыря (например, спазмы мочевого пузыря, недержание мочи, обструкция оттока мочевого пузыря, желудочно-кишечная дисфункция, синдром раздраженного кишечника и диабет), абстинентные симптомы, связанные с прекращением зависимости, и другие состояния, связанные с модуляцией калиевых каналов, такие как, например, респираторные заболевания, эпилепсия, конвульсии, судороги, абсансы, сосудистые спазмы, почечные расстройства (например, поликистоз почек), эректильная дисфункция, секреторная диарея, ишемия, церебральная ишемия, дисменорея, болезнь Рейно, перемежающаяся хромота, синдром Шегрена, аритмия, гипертония, миотоническая мышечная дистрофия, спастичность, ксеростомия, гиперинсулинемия, преждевременные роды, облысение, рак, подавление иммунного ответа, мигрень и боль. Настоящее изобретение также обеспечивает способ модуляции активности калиевого канала у субъекта, включающий стадию введения соединения, описанного в настоящем изобретении. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ положительной модуляции канала SK2 в клетке, включающий стадию контакта клетки с соединением, описанным в настоящем изобретении.

В одном аспекте настоящего изобретения предложенные соединения и композиции используются для лечения тремора. Треморы включают, но не ограничиваются ими, тремор в состоянии покоя, акционный тремор, постуральный, кинетический, интенционный, специфический относительно задачи и идиопатический тремор. В одном аспекте настоящего изобретения предложенные соединения и композиции применяют для лечения постурального и акционного тремора. Примеры постурального и/или акционного тремора включают эссенциальный тремор, вызванный лекарственными средствами паркинсонизм, невропатический тремор и тремор, вызванный токсинами (например, алкогольная абстиненция или тремор от воздействия тяжелых металлов). В одном аспекте настоящего изобретения предложенные соединения и композиции применяют для лечения эссенциального тремора.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способ лечения эссенциального тремора у субъекта, включающий стадию введения соединения или фармацевтически приемлемой соли или композиции, описанных в настоящем изобретении. Эссенциальный тремор является одним из наиболее распространенных неврологических расстройств и затрагивает около 0,9% населения. Отличительным признаком эссенциального тремора является акционный тремор верхних конечностей и, реже, головы, голоса и туловища. Семейный анамнез эссенциального тремора может быть выявлен примерно у половины пациентов, что предполагает наличие генетической составляющей. Употребление алкоголя часто временно уменьшает тремор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, выбранного из нейродегенеративного заболевания, деменции, заболевания сердца, абстинентного синдрома, связанного с прекращением зависимости, метаболического заболевания и заболевания мочевого пузыря. В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, выбранного из атаксии, дистонии, болезни Паркинсона, ишемии, черепно-мозговой травмы, бокового амиотрофического склероза, гипертонии, атеросклероза, диабета, аритмии, гиперактивности мочевого пузыря и симптомов абстиненции, вызванных прекращением злоупотребления алкоголем и другими наркотическими веществами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения атаксии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения спиноцеребеллярной атаксии. В настоящем изобретении предложены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие соединение, описанное в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Указанные композиции можно применять для лечения одного или более заболеваний и состояний, описанных выше. Композиции, описанные в настоящем изобретении, можно вводить перорально, парентерально, в виде ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, букально, вагинально или через имплантируемое депо. Используемый в настоящем изобретении термин "парентеральный" включает методы подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, внутрисиновиальной, интрастернальной, интратекальной, внутрипеченочной, внутрипочечной и внутричерепной инъекции или инфузии. Жидкие лекарственные формы, инъектируемые составы, твердые дисперсионные формы и лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения включены в настоящее изобретение.

Количество предложенных соединений, которые могут быть объединены с материалами носителями для получения композиции в виде единичной лекарственной формы, будет различаться в зависимости от пациента, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложенные композиции могут быть приготовлены так, что дозу в диапазоне 0,01-100 мг/кг массы тела/сутки предложенного соединения, такую как, например, 0,1-100 мг/кг массы тела/сутки, можно вводить пациенту, получающему указанные композиции.

Следует также понимать, что конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, время приема, скорость выведения, комбинацию лекарств, оценку лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Количество обеспечиваемого соединения в композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

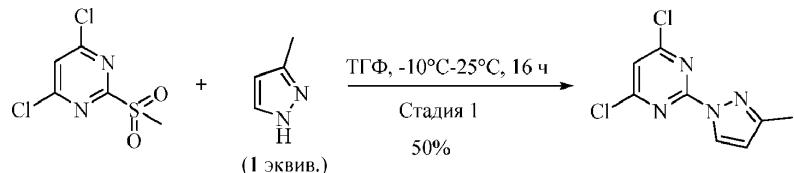
Примеры

Последующие репрезентативные примеры предназначены для того, чтобы помочь проиллюстриро-

вать настоящее изобретение, и не предназначены и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

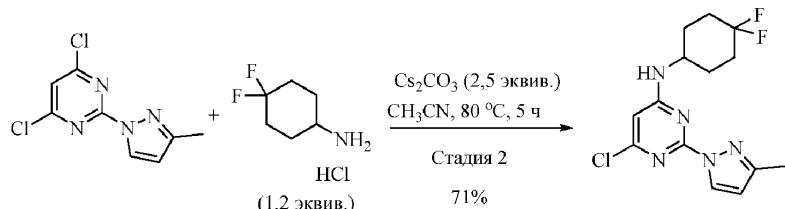
N-(4,4-Дифторциклогексил)-2-(3-метил-1Н-пиразол-1-ил)-6-морфолинопиrimидин-4-амин.

Стадия 1



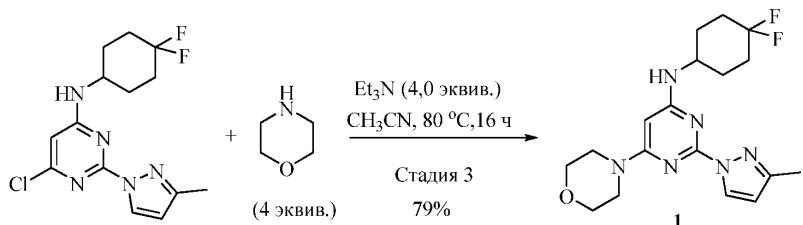
В круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 4,6-дихлор-2-(метилсульфонил)пириимидин (20,0 г, 88,080 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране при -10°C и шприцом по каплям добавляли 3-метил-1Н-пиразол (7,23 г, 88,080 ммоль, 1,0 экв.) в течение 5 мин. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 25°C и завершение реакции определяли с помощью ТСХ. Реакционную смесь смешивали с водой (500 мл) и этилацетатом (500 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией (система растворителей этилацетат/гексан), получая 4,6-дихлор-2-(3-метил-1Н-пиразол-1-ил)пириимидин (10,0 г, 43,859 ммоль, выход 50%) в виде чистого твердого белого вещества. MS(MH⁺): m/z=229,1.

Стадия 2



В круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 2,4-дихлор-6-метилпириимидин (11,0 г, 48,24 ммоль, 1,0 экв.), гидрохлорид 4,4-дифторциклогексан-1-амина (9,89 г, 57,89 ммоль, 1,2 экв.) и Cs₂CO₃ (39,19 г, 120,61 ммоль, 2,5 экв.) в ацетонитриле (200 мл). Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 80°C и завершение реакции определяли с помощью ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и смешивали с водой (100 мл) и этилацетатом (200 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией (система растворителей этилацетат/гексан), в результате чего получали 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3-метил-1Н-пиразол-1-ил)пириимидин-4-амин (11,0 г, 33,62 ммоль, 71%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (MH⁺): m/z=328,1.

Стадия 3



В круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3-метил-1Н-пиразол-1-ил)пириимидин-4-амин (14,0 г, 42,79 ммоль, 1,0 экв.), морфолин (14,91 мл, 171,19 ммоль, 4,0 экв.) и триэтиламин (23,89 мл, 171,19 ммоль, 4,0 экв.) в ацетонитриле (200 мл). Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 80°C и завершение реакции определяли с помощью ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и смешивали с водой (100 мл) и этилацетатом (300 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией (система растворителей этилацетат/гексан), в результате чего получали N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3-метил-1Н-пиразол-1-ил)-6-морфолинопириимидин-4-амин (1) (12,8 г, 33,84 ммоль, выход 79%) в виде грязно-белого твердого вещества. Данные анализа: MS (MH⁺): m/z=379,2;

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,41 (d, J = 2 Гц, 1H), 7,07 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,25 (d, J=2,4 Гц, 1H), 5,53 (c, 1H), 3,9 (уш.с, 1H), 3,67 (t, J=4,4 Гц, 4H), 3,49 (c, 4H), 2,23 (c, 3H), 2,23-1,97 (m, 3H), 1,92-1,90 (m,

3H), 1,55-1,53 (M, 2H).

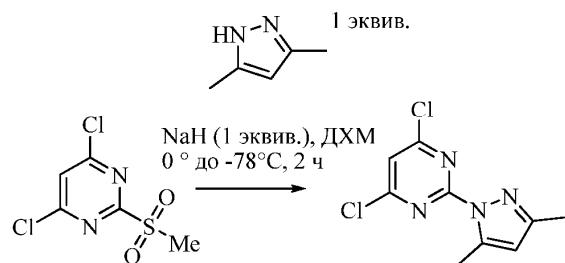
Интегрирование спектра ^1H ЯМР показало 3 сигнала протонного резонанса в ароматической области и 1 широкий сигнал резонанса, соответствующий способному к обмену протону у N-18. Ароматические протоны наблюдались в виде двух дублетов и синглета, что указывало на два соседних и один изолированный ароматические протоны. В алифатической области наблюдались сигналы резонанса, соответствующие 20 протонам, с одним отчетливым синглетом. Интегрирование этих сигналов резонанса показало соответствие двум дублет-дублет сигналам резонанса сильного поля, одному частично перекрывающемуся мультиплету протона и четырем мультиплетам слабого поля, два из которых частично перекрываются. Алифатические мультиплеты сильного поля соответствуют морфолиновому фрагменту структуры. Мультиплеты слабого поля дополнительно расщепляются из-за близости к этим протонам CF_2 . Анализ LC/MS высокого разрешения (high resolution, HR) показал псевдомолекулярный ион ($\text{M}+\text{H}^+$) при низком напряжении фрагментора (70 В) в режиме положительных ионов ESI при m/z 379,20580. Другой выраженный ион, наблюдаемый при m/z 779,38575, относится к димерному аддукту $2\text{M}+\text{Na}^+$, образующемуся в источнике.

Данные ^{13}C ЯМР, полученные от развязанного ^{13}C спектра, снятого при 25°C в CDCl_3 , показали 14 отдельных сигналов резонанса углерода. Указанные 14 сигналов резонанса соответствуют структуре 1, в которой четыре пары из 18 атомов углерода являются спектроскопически эквивалентными. Один сигнал углеродного резонанса (C-12 при 77,05 м.д.) был частично скрыт в спектре сигналом резонанса CHCl_3 . Присутствие углерода с таким сигналом резонанса было подтверждено снятием спектра ^{13}C в C_6D_6 ; сигнал резонанса при 79,7 м.д. наблюдался без помех от пика растворителя в дополнение ко всем другим наблюдаемым сигналам резонанса. Триплет ($2J = 244$ Гц) наблюдается для атома C-22 с сигналом резонанса 122,29 м.д., два дополнительных триплета наблюдаются при 31,53 м.д. (C-21 и C-23, $3J = 24,93$ Гц) и при 31,53 м.д. (C-20 и C-24, $4J = 5,37$ Гц). Каждый из наблюдаемых триплетов согласуется с замещением F2 у атома C-22, а уменьшение константы взаимодействия по отношению к фтору согласуется с увеличением числа промежуточных связей.

Связь углерод-протон и связь углерод-углерод (посредством корреляций С-С-Н через 2 и 3 связи) молекулярной структуры подтверждали снятием двухмерных ЯМР-спектров. Соединение С-Н через одну связь подтверждало HSQC, а соединение через 2 и 3 связи подтверждало НМВС. Короткие и дальние взаимные корреляции (более 2 или 3 связей) соответствуют связям, ожидаемым для предложенной структуры. Наконец, наблюдаемые данные химического сдвига, перечисленные выше, соответствовали предсказанным компьютером химическим сдвигам ^1H и ^{13}C для предложенной структуры.

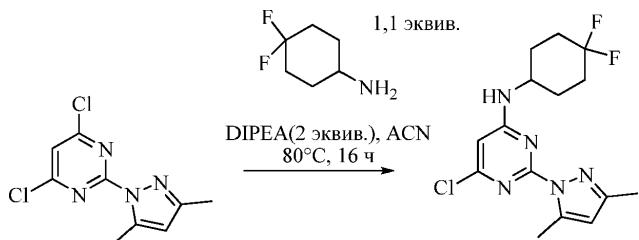
N-(4,4-Дифторциклогексил)-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)-6-метоксикиримидин-4-амин.

Стадия 1



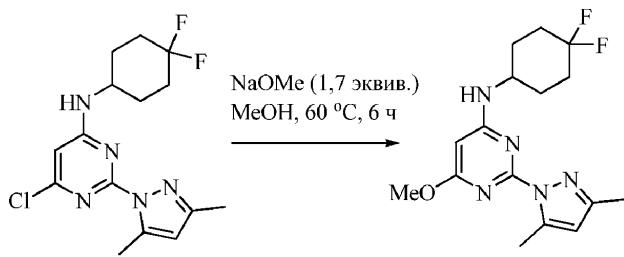
В просущенную на пламени четырёхгорлую круглодонную колбу объёмом 5000 мл, оснащенную присоединённой стеклянным стержнем (горло 1) перемешивающей лопастью (5 см) с тefлоновым покрытием, пробкой (горло 2), капельной воронкой с краном (горло 3) и адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом, (горло 4), загружали суспензию гидрида натрия (35,2 г, 880 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (1000 мл). Затем добавляли 3,5-диметилпиразол (84,6 г, 880 ммоль, 1 экв.) при 0°C и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 30 мин 4,6-дихлор-2-(метилсульфонил)пиридин (200 г, 880 ммоль, 1 экв.) (растворенный в дихлорметане (1000 мл)) прикалывали из капельной воронки к реакционной смеси при -78°C. Реакционную смесь перемешивали при этой же температуре и завершение реакции определяли с помощью TCX и UPLC. Через 2 ч реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси воды при -78°C и разбавляли дихлорметаном. Через 5 мин дихлорметан декантировали и промывали солевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией, используя этилацетат и петролейный эфир в качестве растворителя, в результате чего получали 4,6-дихлор-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)пиридин (138 г, 567,71 ммоль, выход 65%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (M⁺): m/z = 244,2.

Стадия 2



В просушенную на пламени трёхгорлую круглодонную колбу объемом 2000 мл, оснащенную мешалкой (5 см) с тефлоновым покрытием, одной резиновой прокалываемой пробкой (septa) (горло 1), пробкой (горло 3) и обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом (горло 2), загружали раствор 4,6-дихлор-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)пиrimидина (136 г, 559,4 ммоль, 1 экв.) в ацетонитриле (1500 мл), затем гидрохлорид 4,4-дифторциклогексиламина (105,6 г, 615,4 ммоль, 1,1 экв.) и N,N-дизопропилэтиламин (194,88 мл, 1118,8 ммоль, 2 экв.). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 16 ч. Завершение реакции определяли с помощью TCX и UPLC. Реакционную смесь упаривали, а остаток растирали с водой (500 мл). Полученное твердое вещество отфильтровывали, промывали петролейным эфиром, высушивали в вакууме, в результате чего получали 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)пиrimидин-4-амин (191 г, 556 ммоль, выход более 95%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (MH^+): $m/z = 342,0$.

Стадия 3



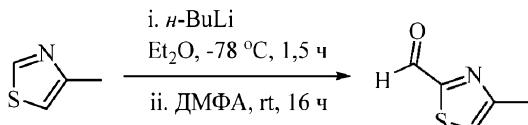
2

В просушенную на пламени трёхгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, оснащенную мешалкой (2 см) с тефлоновым покрытием, одной резиновой прокалываемой пробкой (septa) (горло 1), пробкой (горло 3) и обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом, (горло 2), загружали раствор 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)пиrimидин-4-амина (20 г, 58,51 ммоль, 1 экв.) в метаноле, а затем метоксид натрия (21% в метаноле, 5,37 г, 99,47 ммоль, 1,7 экв.). Реакционную смесь нагревали до 60°C и завершение реакции определяли с помощью TCX и UPLC. Через 5 ч реакционную смесь упаривали при пониженном давлении, а остаток разбавляли этилацетатом, промывали водой и солевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией, используя этилацетат и петролейный эфир в качестве системы растворителей, в результате чего получали N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)-6-метоксипиrimидин-4-амин (2) [16 г (11 г (чистота 99%) + 5 г (чистота 92%), 47,41 ммоль, выход около 80%) в виде белого твердого вещества. MS (MH^+): $m/z = 338,1$. Данные анализа:

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,45 (ущ.с, 1H), 6,06 (с, 1H), 5,72 (с, 1H), 4,01 (ущ.с, 1H), 3,85 (с, 3H), 2,55 (с, 3H), 2,17 (с, 3H), 2,11-1,82 (м, 6H), 1,60-1,55 (м, 2H).

N-(4,4-Дифторциклогексил)-6-метокси-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-амин.

Стадия 1



В трёхгорлую круглодонную колбу, снаженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали диэтиловый эфир (250 мл) и при -78°C вносили n-BuLi (241,98 мл, 604,96 ммоль, 2,5M в гексане). Раствор 4-метилтиазола (50,0 г, 504,13 ммоль) в диэтиловом эфире (200 мл) добавляли в течение 30 мин. Реакционная смесь превращалась в бледно-желтую суспензию. Через 1,5 ч добавляли DMFA (58,54 мл, 756,20 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре 16 ч. Ход реакции контролировали с помощью TCX. После завершения реакции смесь выливали в холодный водный раствор HCl (400 мл, 4N) при перемешивании и отделяли два слоя. Органический слой промывали холодным водным раствором

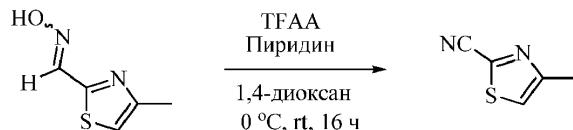
HCl (2×80 мл, 4N). Комбинированные водные слои медленно подщелачивали K₂CO₃ (pH 7) и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×150 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и упаривали досуха при комнатной температуре в вакууме, получая 4-метилтиазол-2-карбальдегид (60,0 г, неочищенный) в виде бледно-желтой жидкости. Это неочищенное вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2



В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 4-метилтиазол-2-карбальдегид (60,0 г, неочищенный) в пиридине (38,04 мл, 472,40 ммоль). Гидрохлорид гидроксиламина (32,82 г, 472,40 ммоль) добавляли порциями в течение 15 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 16 ч под атмосферой азота. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь выливали в ледяную воду и перемешивали 20 мин, полученное твердое вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме, получая оксим 4-метилтиазол-2-карбальдегида (40,0 г, 281,69 ммоль, выход с двух стадий 59%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (M⁺): m/z=143,0.

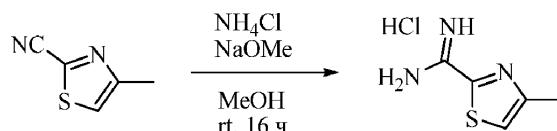
Стадия 3



В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали раствор оксима 4-метилтиазол-2-карбальдегида (35,0 г, 246,44 ммоль) и пиридина (87,33 мл, 1084,35 ммоль) в 1,4-диоксане (140 мл). Трифторуксусный ангидрид (51,38 мл, 369,66 ммоль) медленно добавляли при -10°C и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре 16 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь разбавляли водой (250 мл) и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×350 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2×250 мл), солевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении, получая 4-метилтиазол-2-карбонитрил (35,0 г, неочищенный) в виде светло-коричневой жидкости. Это неочищенное вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Данные анализа:

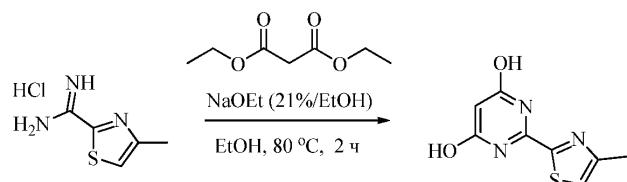
¹Н ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,90 (с, 1H), 2,51 (с, 3H).

Стадия 4



В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 4-метилтиазол-2-карбонитрил (35,0 г, неочищенный) в метаноле (280 мл) и добавляли метоксид натрия (16,77 г, 310,45 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре 3 ч добавляли хлорид аммония (30,19 г, 564,66 ммоль) и перемешивали еще 16 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь фильтровали и промывали метанолом. Фильтрат упаривали при пониженном давлении и остаток растирали с диэтиловым эфиром (150 мл). Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме, получая гидрохлорид 4-метилтиазол-2-карбоксимидамида (35,0 г, неочищенный) в виде грязно-белого твердого вещества. Это неочищенное вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. MS (M⁺): m/z=142,0.

Стадия 5

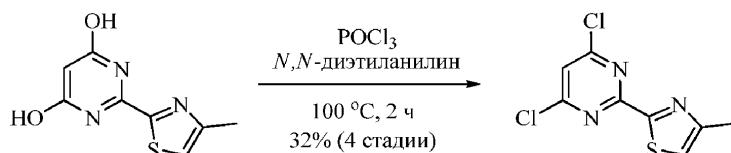


В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали гидрохлорид 4-метилтиазол-2-карбоксимидамида (35,0 г, неочищенный) в этаноле (350 мл) и диэтилмалонат (150,81 мл, 988,64 ммоль). Этоксид натрия (320 мл, 988,64 ммоль, 21% в EtOH) при капывании при комнатной температуре и смесь нагревали до 85°C. Через 3 ч реакционную смесь упаривали при пони-

женнем давлении. Добавляли воду (20 мл) и подкисляли 1,5N HCl (pH 2-3). Полученное твердое вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме, получая 2-(4-метилтиазол-2-ил)пиримидин-4,6-диол (29,0 г, неочищенный) в виде бледно-жёлтого твердого вещества.

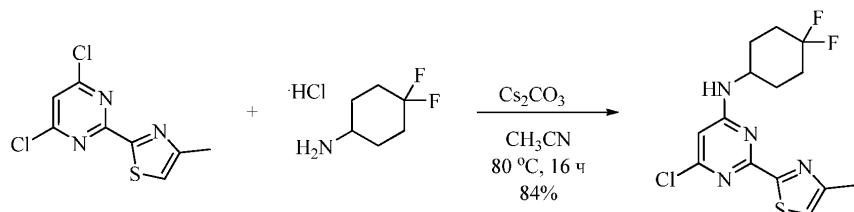
Это неочищенное вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. MS (MH^+): $m/z=210,0$.

Стадия 6



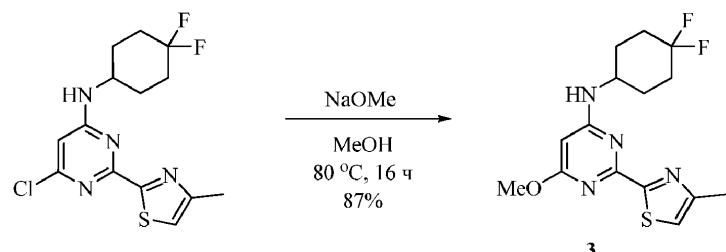
В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали суспензию 2-(4-метилтиазол-2-ил)пиримидин-4,6-диола (29,0 г, неочищенный) и POCl_3 (290 мл). N,N -Диэтиланилин (37,84 мл, 235,85 ммоль) добавляли при комнатной температуре и смесь нагревали с обратным холодильником при 100°C в течение 2 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Избыток POCl_3 удаляли перегонкой. Остаток разбавляли 500 мл холодной воды, нейтрализовали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия, экстрагировали диэтиловым эфиром (2×500 мл). Объединенные органические слои промывали водой (3×200 мл), солевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Остаток растирали с н-пентаном (100 мл). Полученное твердое вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме, получая 2-(4,6-дихлоропиримидин-2-ил)-4-метилтиазол 7 (19,5 г, 79,59 ммоль, выход с четырёх стадий 32%) в виде бледно-желтого твёрдого вещества. MS (MH^+): $m/z=245,9$.

Стадия 7



В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали суспензию 2-(4,6-дихлоропиримидин-2-ил)-4-метилтиазола (19,0 г, 77,56 ммоль) и гидрохлорида 4,4-дифторциклогексана-1-амина (13,30 г, 77,56 ммоль) в ацетонитриле (190 мл). Добавляли карбонат цезия (37,89 г, 116,34 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 16 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и твердое вещество промывали этилацетатом (500 мл). Фильтрат промывали водой (2×100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (60-120 силикагель), элюируя 15% этилацетата в гексане. Подходящие фракции, содержащие требуемое соединение, объединяли и упаривали досуха при пониженном давлении, получая 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиримидин-4-амин (22,5 г, 65,25 ммоль, выход 84%) в виде грязно-белого пенообразного твердого вещества. MS (MH^+): $m/z=344,9$.

Стадия 8

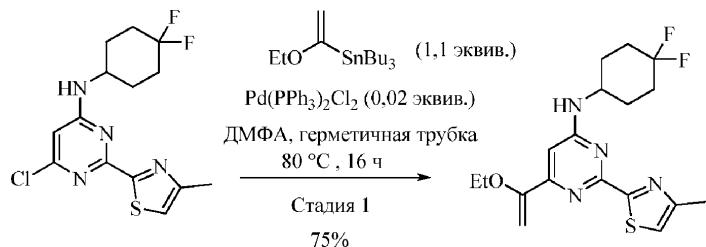


В двугорлую круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиримидин-4-амин (27,0 г, 78,47 ммоль) в метаноле (450 мл). Добавляли метоксид натрия (21,19 г, 392,36 ммоль) и нагревали до 80°C в течение 16 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Избыток метанола удаляли при пониженном давлении, а остаток разбавляли 10% водным раствором хлорида аммония (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×150 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2×100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (60-120 силикагель), элюируя 35-40% этилацетата в гексане. Подходящие фракции, содержащие целевое соединение, объединяли и упаривали досуха при пониженном давлении с получением N-(4,4-дифторциклогексил)-6-метокси-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиримидин-4-амина (3) (23,4 г, 68,82

ммоль, выход 87%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (MH⁺): m/z=341,0. Данные анализа:

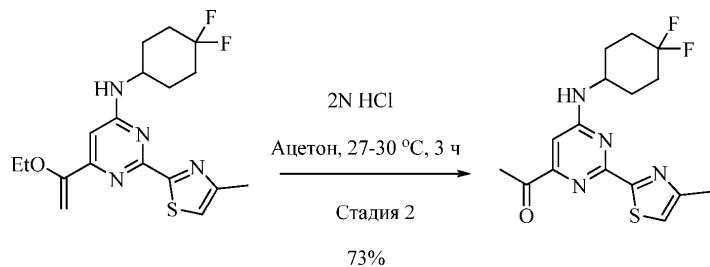
¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 7,41 (с, 1H), 7,40 (с, 1H), 5,81 (с, 1H), 3,87 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,08-1,89 (м, 6H), 1,61-1,52 (м, 2H).

(S)-1-((4,4-Дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-ил)этан-1-ол.
Стадия 1



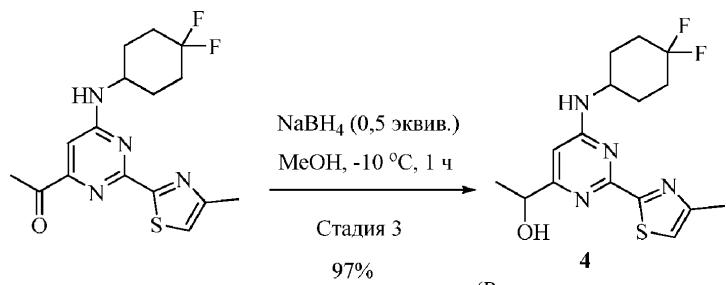
В герметично закрываемую трубку объёмом 250 мл, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием (2 см), загружали раствор 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-амина (4,9 г, 14,24 ммоль, 1,0 экв.) и (1-этоксивинил)трибутилолова (5,65 г, 15,66 ммоль, 1,1 экв.) в N,N-диметилформамиде (60 мл). Реакционную смесь дегазировали, используя газообразный аргон в течение 5-10 мин, и затем добавляли к смеси дихлорид бис(трифенилфосфин)пallадия(II) (0,2 г, 0,28 ммоль, 0,02 экв.). Реакционную смесь герметично закрывали и нагревали при 80°C в течение 16 ч (завершение реакции определяли с помощью LCMS) и охлаждали до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляли водой (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×150 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали, получая неочищенный продукт в виде светло-коричневого клейкого твердого вещества. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (система растворителей этилацетат/гексан) с получением N-(4,4-дифторциклогексил)-6-(1-этоксивинил)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-амина (4,1 г, 10,78 ммоль, выход 75%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (MH⁺): m/z=381,0.

Стадия 2



В круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали N-(4,4-дифторциклогексил)-6-(1-этоксивинил)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-амин (9,0 г, 23,67 ммоль, 1,0 экв.) в ацетоне (120 мл) и затем добавляли 2N водный раствор соляной кислоты (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 ч и завершение реакции определяли с помощью LCMS. Реакционную смесь упаривали для удаления ацетона, разбавляли ледяной водой (100 мл), подщелачивали насыщенным раствором карбоната натрия и экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт в виде светло-коричневого клейкого твердого вещества. Неочищенное вещество очищали с помощью колоночной хроматографии (система растворителей этилацетат/гексан) с получением 1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-ил)этан-1-она (6,1 г, 17,32 ммоль, выход 73%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (MH⁺): m/z=353,0.

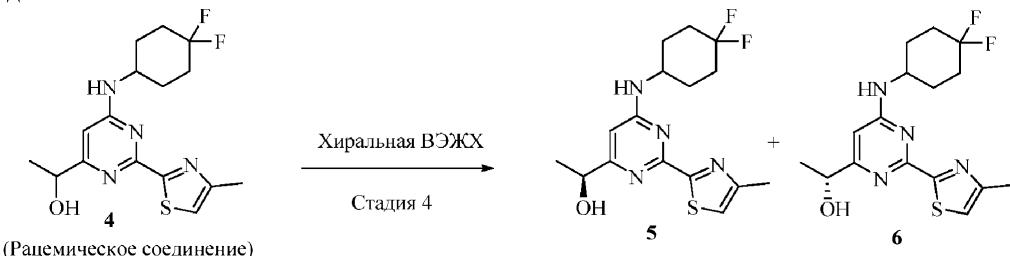
Стадия 3



В круглодонную колбу, снабженную мешалкой с тефлоновым покрытием, загружали 1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиrimидин-4-ил)этан-1-он (5,6 г, 15,90 ммоль, 1,0 экв.) в метаноле (80 мл) при -10°C, а затем добавляли боргидрид натрия (0,302 г, 7,95 ммоль, 0,5 экв.).

Реакционную смесь перемешивали при этой температуре 1 ч и завершение реакции определяли с помощью LCMS. Реакцию останавливали, добавляя в реакционную смесь воду, и упаривали при пониженном давлении для удаления метанола. Остаток разбавляли ледяной водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали при пониженном давлении, получая 1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4-ил)этан-1-ол 4 (5,5 г, 15,53 ммоль, выход 97%) в виде грязно-белого твердого вещества рацемической смеси. MS (M⁺): m/z=355,0.

Стадия 4



Рацемическое соединение 1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4-ил)этан-1-ол 4 (5,5 г) очищали хиральной ВЭЖХ (колонка: Chiralpak-IC (250×20×5,0 мкм); подвижная фаза-А: н-гексан (0,1% диэтиламин), подвижная фаза-В: изопропиловый спирт:ДХМ (90:10), изократический режим: 50:50 (А:В); скорость потока: 15,0 мл/мин; 120/ввод пробы; время выполнения: 15 мин) с получением (S)-1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазола)-2-ил)пиридин-4-ил)этан-1-ола 5 (2,1 г, 5,93 ммоль, выход 38%) в виде грязно-белого твердого вещества из первых элюирующихся фракций (пик-1, время удерживания = 4,24 мин). MS (M⁺): m/z=355,0.

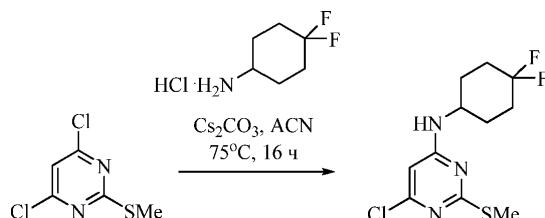
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,59-7,57 (д, J=6,0 Гц, 1H), 7,37(с, 1H), 6,64 (с, 1H), 5,37-5,36 (д, J=4,4 Гц, 1H), 4,52-4,50 (т, J= 11,2 Гц, 5,6 Гц, 1H), 4,05 (уш.с, 1H), 2,43 (с, 3H), 2,10-1,96 (м, 6H), 1,62-1,59 (м, 2H), 1,35-1,33 (д, J=6,4 Гц, 3H).

Другой энантиomer: (R)-1-((4,4-дифторциклогексил)амино)-2-(4-метилтиазол-2-ил)пиридин-4-ил)этан-1-ол 6 (2,05 г, 5,78 ммоль, выход 37%) в виде грязно-белого твердого вещества из вторых элюирующихся фракций (пик-2, время удерживания = 6,45 мин). MS (M⁺): m/z=355,0.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,60-7,59 (д, J = 5,6 Гц, 1H), 7,37(с, 1H), 6,64 (с, 1H), 5,38 (уш.с, 1H), 4,52-4,51 (д, J = 6,8 Гц, 1H), 4,10 (уш.с, 1H), 2,43 (с, 3H), 2,10-1,91 (м, 6H), 1,65-1,57 (м, 2H), 1,35-1,34 (д, J = 6,8 Гц, 3H).

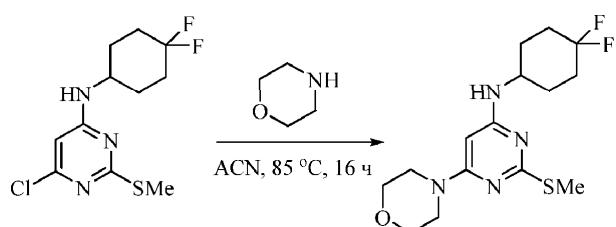
2-(3-Циклопропил-1Н-пиразол-1-ил)-N-(4,4-дифторциклогексил)-6-морфолинопиридин-4-амин.

Стадия 1



В просушенную на пламени трёхгорлую круглодонную колбу объемом 1000 мл, оснащенную мешалкой (3 см) с тефлоновым покрытием, одной резиновой прокалываемой пробкой (septa) (горло 1), пробкой (горло 3) и обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом (горло 2), загружали раствор 4,6-дихлор-2-(метилтио)пиридинина (150 г, 768,94 ммоль, 1,0 экв.) в ацетонитриле (1500 мл), а затем добавляли гидрохлорид 4,4-дифторциклогексиламина (158,35 г, 922,733 ммоль) и карбонат цезия (526 г, 1614 ммоль, 2,1 экв.). Реакционную смесь нагревали при 75°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали для удаления карбоната цезия, затем фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая 210 г (выход 93%) 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(метилтио)пиридин-4-амина в виде бледно-желтого твердого вещества. MS (M⁺): m/z = 294,0.

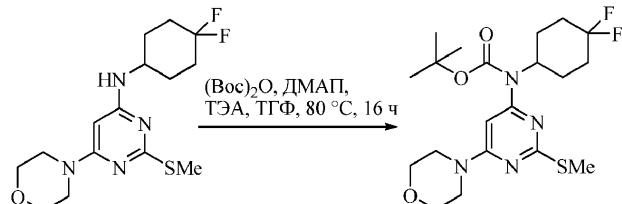
Стадия 2



Раствор 6-хлор-N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(метилтио)пиридин-4-амина (60 г, 204,24 ммоль,

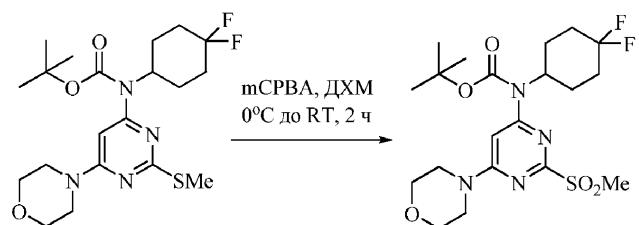
1,0 экв.) и морфолина (35,6 мл, 408,48 ммоль, 2,0 экв.) в ацетонитриле (600 мл) нагревали при 85°C в герметично закрытой трубке в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь упаривали и к полученному остатку добавляли ледяную воду. Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали водой (500 мл), гексаном (250 мл), высушивали в высоком вакууме, получая N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(метилтио)-6-морфолинопиримидин-4-амин в виде грязно-белого твердого вещества (62 г, выход 88%). MS (M⁺): m/z = 345,2.

Стадия 3



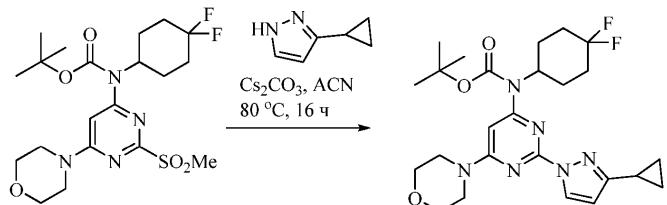
В просушенную на пламени трёхгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную мешалкой (3 см) с тефлоновым покрытием, одной резиновой прокалываемой пробкой (septa) (горло 1), пробкой (горло 3) и обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом (горло 2), загружали раствор N-(4,4-дифторциклогексил)-2-(метилтио)-6-морфолинопиримидин-4-амина (1 г, 2,90 ммоль) в тетрагидрофуране (15 мл), затем добавляли 4-N,N-диметиламинопиридин (0,1 г, 0,87 ммоль, 0,3 экв.), триэтиламин (1,2 мл, 8,71 ммоль, 3,0 экв.) и ди-трет-бутилдикарбонат (3,16 г, 14,51 ммоль, 5,0 экв.), затем реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 16 ч. После завершения реакции в реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали этилацетатом (2×75 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, получая трет-бутил-(4,4-дифторциклогексил)(2-(метилтио)-6-морфолинопиримидин-4-ил)карбамат в виде желтой смолы (1,1 г, выход 85%). MS (M⁺): m/z = 445,2.

Стадия 4



В одногорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом, и мешалкой (1 см) с тефлоновым покрытием, загружали раствор трет-бутил-(4,4-дифторциклогексил)(2-(метилтио)-6-морфолинопиримидин-4-ил)карбамата (50 г, 112,47 ммоль) в дихлорметане (600 мл), а затем добавляли 3-хлорпербензойную кислоту (м-хлорпербензойная кислота) (58,2 г, 337,42 ммоль, 3,0 экв.) при 0°C. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин. После завершения реакции в реакционную смесь добавляли насыщенный раствор гидрокарбоната и экстрагировали дихлорметаном (2×250 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, получая трет-бутил-(4,4-дифторциклогексил)(2-(метилсульфонил)-6-морфолинопиримидин-4-ил)карбамат в виде грязно-белой смолы (52 г, выход 97%). MS (M⁺): m/z = 477,3.

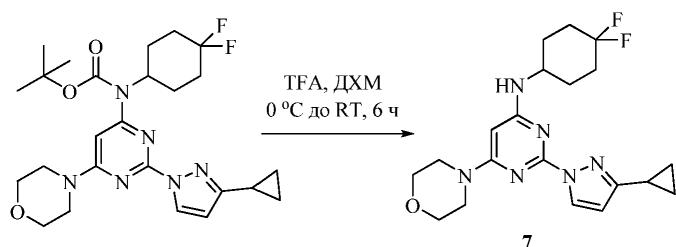
Стадия 5



В одногорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом, и мешалкой (2 см) с тефлоновым покрытием, загружали раствор трет-бутила-(4,4-дифторциклогексил)(2-(метилсульфонил)-6-морфолинопиримидин-4-ил)карбамата (0,9 г, 1,88 ммоль) в ацетонитриле (10 мл), а затем добавляли 3-циклогексил-1Н-пиразол (0,3 г, 2,83 ммоль, 1,5 экв.) и карбонат цезия (1,23 г, 3,77 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 16 ч и завершение реакции определяли с помощью ТСХ и LCMS. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, используя силикагель 60-120 с системой растворителей этилацетат-петролейный эфир.

Выделенное вещество высушивали в вакууме, получая трет-бутил-(2-(3-циклогексил-1Н-пиразол-1-ил)-6-морфолинопиримидин-4-ил)(4,4-дифторциклогексил)карбамат в виде грязно-белого твердого вещества (0,8 г, выход 84%). MS (M⁺): m/z = 505.

Стадия 6



В просушенную на пламени трёхгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную мешалкой (2 см) с тефлоновым покрытием, одной резиновой прокалываемой пробкой (septa) (горло 1), пробкой (горло 3) и обратным холодильником с адаптером для подачи газообразного азота с U-образной трубкой, заполненным маслом (горло 2), загружали раствор трет-бутил-(2-(3-циклогексил-1Н-пиразол-1-ил)-6-морфолинопиримидин-4-ил)(4,4-дифторциклогексил)карбамата (1,2 г, 1,98 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (40 мл), а затем добавляли трифторуксусную кислоту (2,5 мл, 32,55 ммоль, 16,4 экв.) при 0°C. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали при этой температуре в течение 6 ч. Завершение реакции определяли с помощью TCX и UPLC. Реакционную смесь упаривали и к полученному остатку добавляли 10% насыщенный раствор гидрокарбоната натрия, экстрагировали этилацетатом (2×100 мл) и упаривали при пониженном давлении, что давало неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, используя силикагель 60-120, систему растворителей этилацетат-петролейный эфир. Полученное твердое вещество высушивали в вакууме, что давало 2-(3-циклогексил-1Н-пиразол-1-ил)-N-(4,4-дифторциклогексил)-6-морфолинопиримидин-4-амин 7 (0,73 г, выход 90%). MS (M⁺): m/z=405. Данные анализа:

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,39 (d, J=2,4 Гц, 1H), 7,08 (d, J=8,0 Гц, 1H), 6,14 (d, J=2,80 Гц, 1H), 5,53 (c, 1H), 3,88 (c, 1H), 3,69-3,67 (m, 4H), 3,50 (m, 4H), 1,99-1,90 (m, 7H), 1,56-1,54 (m, 2H), 0,93-0,89 (m, 2H), 0,72-0,71 (m, 2H).

Биологические анализы.

Биологическую активность определяли следующим образом.

Ионный ток через Ca²⁺-зависимые (Ca²⁺-активируемые) K⁺-каналы малой проводимости (каналы SK, подтип 2) измеряли с использованием whole cell конфигурации метода локальной фиксации потенциала (пэч-кламп (англ. patch-clamp)) на установке локальной фиксации потенциала с использованием клеток культуры ткани HEK-293, экспрессирующих каналы SK2, как описано в статье Hougaard et al., British Journal of Pharmacology 151, 655-665, May 8, 2007, все принципы которой включены в настоящее изобретение посредством ссылки. В одном аспекте соединение определяют как положительный аллостерический модулятор (ПАМ) SK, если соединение усиливает ток в указанном анализе, например, если значение SC₁₀₀ соединения меньше или равно 10 мкМ, что определяется указанным анализом. Значение SC₁₀₀ определяется как концентрация соединения, которая увеличивает базальный ток на 100%.

Значения SC₁₀₀ приведены в табл. 1.

Для исследования терапевтического эффекта соединения 1 на индуцированный гармалином тремор, самцам крыс Спрег-Доули перорально вводили либо носитель, либо 10 или 30 мг/кг соединения 1 за 30 мин до инъекции гармалина. Сразу после инъекции гармалина животных помещали в устройство для количественной оценки тремора и проводили количественную оценку случаев тремора в течение 60 мин. Сигнал события тремора генерировался, когда небольшая металлическая полоса-датчик, закреплённая на правой передней лапе животного, двигалась в электромагнитном поле, генерируемом рамочной антенной внутри испытательного устройства. Выходы из усилителя оцифровывались с частотой регистрации 1000 Гц, а сигнал обрабатывали и анализировали с использованием программного обеспечения LabView (National Instruments). Чтобы минимизировать сигнал от двигательной активности и груминга, к сигналу применяли 128-мс фильтр невзвешенного скользящего среднего, а события с амплитудами более 0,5 В и продолжительностью более 300 мс засчитывали как событие тремора. Данные анализировали с шагом в 1 мин в течение анализа и представляли как сумму событий тремора за весь 60-минутный анализ. Как показано на фиг. 1, значительное ингибирирование тремора наблюдалось при дозе 30 мг/кг соединения 1. Снижение тремора соединением 1 было также продемонстрировано измерением частоты тремора всего тела с помощью акселерометра с пластиной. Тремор всего тела измеряли с помощью San Diego Instruments Tremor Monitor (Сан-Диего, Калифорния, США). Животным предварительно перорально вводили 3, 10 или 30 мг/кг соединения 1 за 30 мин до внутрибрюшинного введения 5 мг/кг гармалина. Тремор измеряли в течение 30 мин после введения гармалина, и данные анализировали с помощью быстрого преобразования Фурье и представляли в виде спектра мощности по частоте. Гармалин вызывал значительное усиление спектра мощности в диапазоне частот от 10 до 14 Гц. В этом диапазоне все дозы 3, 10 и

30 мг/кг значительно уменьшали трепет. Данные были также проанализированы расчетом процента мощности движения (%МД), определяемым как мощность в диапазоне 9-13 Гц, делённая на общую мощность по всему спектру (0-30 Гц) и умноженная на 100. Согласно этому анализу, дозы 3, 10 и 30 мг/кг значительно снижали индуцированный гармалином трепет (гармалин + носитель (n = 13); гармалин + 3 мг/кг соединения 1 (n = 8), P < 0,01; 10 мг/кг соединения 1 (n = 16) и 30 мг/кг соединения 1 (n = 13), соответственно, P < 0,05) (фиг. 2).

Взятые вместе указанные данные показывают, что соединение 1 значительно уменьшает индуцированный гармалином трепет, измеренный двумя различными экспериментами.

Степень, в которой соединения модулируют каналы SK2 *in vivo*, выражается величиной % SK2 SC₁₀₀, которая представляет собой отношение концентрации свободного лекарства в головном мозге к измеренной активности соединения на канале SK2. Указанную величину рассчитывают следующим образом: C_{FB} = C_{MB} × BFF, где C_{MB} - измеренная методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии концентрация соединения, выделенного из головного мозга, собранного сразу после регистрации трепета (табл. 1 "Измеренная концентрация в головном мозге"), C_{FB} - это количество свободного соединения, не связанного с белком и, следовательно, свободного для взаимодействия с каналом SK2 (табл. 1 "Рассчитанная свободная концентрация в головном мозге"), BFF - это средняя свободная фракция соединения, измеренная с помощью равновесного диализа в отдельных экспериментах (концентрация для анализа 1 мкМ, инкубированная в 10% гомогенате ткани мозга крысы в течение 5 ч при 37°C) (табл. 1 "Свободная фракция в головном мозге"). Свободное лекарство в головном мозге, доступное для взаимодействия с каналами SK2 (C_{FB}), находят умножением измеренного общего уровня в головном мозге (C_{MB}) на среднюю свободную фракцию (BFF).

Количество свободного соединения затем выражается через его активность в отношении канала SK2 следующим образом: % SK2 SC₁₀₀ = C_{FB}/SK2 SC₁₀₀ × 100, где SK2 SC₁₀₀ (табл. 1, "SK2 SC₁₀₀") - это измеренное значение активности соединения на каналах SK2 и %SK2 SC₁₀₀ (табл. 1, "% SK2 SC₁₀₀") - это свободная концентрация в головном мозге (C_{FB}), делённая на SK2 SC₁₀₀. Значения приведены в табл. 1.

Таблица 1

Соединение	Минимальная эффективная доза (мг/кг)	Измеренная концентрация в головном мозге (мкМ)	Измеренная свободная фракция в головном мозге	Рассчитанная свободная концентрация в головном мозге (мкМ)	Измеренная величина SK2 SC ₁₀₀ (мкМ)	Рассчитанная величина %SK2 SC ₁₀₀
1	30	1.3	0,065	0,08	0,5	16

Эффект на нерегулярность возбуждения клеток Пуркинье в срезах *ex vivo* от трансгенных мышей SCA2 58Q.

В срезах мозжечка мышей SCA2 58Q нейроны Пуркинье демонстрируют хаотическое возбуждение, которое можно измерить как увеличение коэффициента вариации интервала между спайками (coefficient of variation of the interspike interval, ISI CV), что является мерой регулярности интервала возбуждения между потенциалами действия. Разница в ISI CV для мышей дикого типа (N = 8) и SCA2 58Q (N = 11) показана на фиг. 3 (P < 0,005). Также показано, что последовательное нанесение на поверхность раствора (bath application) с 1 (N = 11) или 3 мкМ (N = 10) соединения 1 частично обратило увеличение ISI CV, наблюдаемое в срезах мозжечка у одиннадцатимесячных мышей SCA2 58Q (P < 0,05). Эти данные указывают на то, что соединение 1 регулирует возбуждение клеток Пуркинье путём частичного восстановления интервала между спайками в указанной мышиной модели спиноцеребеллярной атаксии.

Оценка эффекта соединения на эпизодическую атаксию 2-го типа (EA2) в мышиной модели Tottering.

Соединение 1 продемонстрировало эффективность в утверждённых животных моделях наследственной атаксии (EA2) и ET (индуцированный гармалином трепет). Чтобы проанализировать, может ли соединение 1 облегчить атаксию в модели заболевания, его оценивали на мышиной модели EA2 "Tottering". У этих мышей обнаружена базальная атаксия, возникающая из-за нерегулярности при песямейкерном возбуждении клеток Пуркинье из-за мутации с потерей функции каналов P/Q Ca²⁺ (того же белка, который мутирует в SCA6), что вызывает эпизодическую атаксию 2-го типа (EA2). Животных оценивали в камере с полом из параллельных прутьев, которая автоматически подсчитывает, сколько раз лапа животного проскальзывает между равномерно расположеными металлическими прутьями, и общее расстояние, которое проходит животное. Затем базальную атаксию выражали в виде отношения атаксии, которое представляет собой общее количество проскальзываний лапы, деленное на общее расстояние, которое животное проходит в сантиметрах. Увеличение отношения атаксии у мышей дикого типа и мышей EA2 показано на фиг. 4.

В этом исследовании мышам EA2 (возраст 8-10 месяцев; n = 18) внутрибрюшинно вводили соединение 1 или носитель за 30 мин до помещения в камеру с полом из параллельных прутьев. Животных оценивали по схеме перекрестного исследования, при этом каждое животное получало как носитель, так и 10 мг/кг соединения 1. Три дня оставляли между дозами для вымывания соединения. В дозе, вводимой

в этом исследовании, соединение 1 полностью обращало увеличение отношения атаксии, наблюдаемое у EA2 по сравнению с мышами дикого типа. Эти данные указывают на то, что соединение 1 восстанавливает нормальную работу в отношении данного показателя двигательной функции в модели наследственной мозжечковой атаксии.

Сравнительные преимущества.

Следующие исследования иллюстрируют дальнейшие технические преимущества соединений, раскрытых в настоящем изобретении.

Определение растворимости соединений в воде (кинетическая растворимость) было проведено в натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) методом встряхиваемой колбы. В этом анализе стоковый раствор анализируемого соединения в ДМСО добавляли в буфер с последующим приведением в равновесие (встряхиванием), фильтрацией и определением растворённого количества с помощью ВЭЖХ-УФ. Условия, использованные в анализе, приведены ниже. Результаты показаны в табл. 2 и 3.

Концентрация соединения: 200 мкМ с 1% ДМСО (n = 2).

Водный буфер: 0,05М фосфатно-буферная система, рН 7,4.

Период приведения в равновесие: 16 ч при комнатной температуре (~23°C) при перемешивании.

Подготовка пробы: фильтрация.

Анализ: ВЭЖХ-УФ.

Эталонные соединения: кофеин (высокая растворимость) и диэтилстилбестрол (низкая растворимость).

Характеристику метаболической стабильности соединений проводили в микросомах печени. В этом анализе тестируемое соединение инкубируют с микросомами печени в присутствии NADPH в течение 2 временных точек при 37°C. В конце инкубации реакцию заканчивают, добавляя ацетонитрил, содержащий внутренний стандарт, и количество оставшегося исходного соединения определяют методом LC-MS/MS. Условия, использованные в анализе, приведены ниже. Результаты приведены в табл. 2.

Время инкубации: 0 и 30 мин при рН 7,4, 37°C.

Анализируемая концентрация: 1 мкМ в 0,02% ДМСО при рН 7,4 (n = 2).

Концентрация NADPH в анализе: 1 мМ.

Концентрация белка в микросомах печени в анализе: 0,5 мг/мл.

Анализ: LC-MS/MS.

Представленные данные: % оставшегося исходного соединения (% Parent Compound Remaining, %PCR).

Эталонные соединения для высокого и низкого клиренса включены.

Проанализированные виды: мышь, крыса, собака, обезьяна и человек.

Соединения, описанные в настоящем изобретении, были проанализированы на ингибирование CYP для 5 изоформ (3A4, 2D6, 2C9, 2C19 и 1A2). В этом анализе специфические субстраты для изоформы CYP инкубируют с микросомами печени человека (human liver microsome, HLM) в присутствии тестируемых соединений и определяют образование метаболитов. Рассчитывают процент ингибирования образования метаболитов при различных концентрациях испытуемого соединения и определяют IC₅₀. Условия, использованные в анализе, приведены ниже. Результаты приведены в табл. 2.

Концентрация анализируемого лекарства (ингибитора): 8 различных концентраций (от 100 до 0,005 мкМ).

Матрица: микросомы печени человека (Invitrogen, life technologies).

Для изоформ использовались специфичные маркерные субстраты, как указано ниже:

CYP3A4: мидазолам.

CYP2D6: буфуралол.

CYP2C9: диклофенак.

CYP2C19: мефинитоин.

CYP1A2: фенацетин.

Кофакторы: NADPH (1 мМ конечная концентрация в анализе).

Анализ образцов: LC-MS/MS (метаболиты).

Специфичные эталонные ингибиторы включены во все анализы (кетоконазол/хинидин/сульфафеназол/тиклопидин/фурафиллин).

Буфер: калий-фосфатный буфер (100 мМ), рН 7,4.

Уровень ДМСО в анализе: 0,1%.

Анализ данных: % ингибирования по сравнению с контролем.

Соединения тестируали в анализе hERG калиевого канала сердца. hERG ответственен за быстрый компонент выпрямляющего калиевого тока (I_{Kr}) в желудочках сердца человека. Ингибирование I_{Kr} является наиболее частой причиной продления потенциала действия в сердце не сердечными лекарствами. См., например, Brown, A.M. and Rampe, D. (2000). Drug-induced long QT syndrome: is HERG the root of all evil? Pharmaceutical News 7, 15-20.

Клетки HEK-293 стабильно трансфицировали кДНК hERG. Стабильные трансфектанты отбирали коэкспрессией гена устойчивости к G418, включенного в плазмиду экспрессии. Давление отбора обеспе-

чивалось добавлением G418 в культуральную среду. Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко/смеси питательных веществ F-12 (D-MEM/F-12) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед./мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 500 мкг/мл G418. Записи о клеточных культурах хранятся в архиве Charles River Laboratories.

Клетки переносили в записывающую камеру и заливали контрольным раствором носителя. Пипетируемый раствор для записи цельных клеток (состав в mM): аспартат калия, 130; MgCl₂, 5; ЭГТА, 5; АТФ, 4; HEPES, 10; pH доводили до 7,2 с помощью KOH. Пипетируемый раствор готовили порциями, аликвотировали, хранили в замороженном виде и свежую аликвоту оттаивали каждый день. Пэтч-пипетки изготавливали из стеклянных капиллярных трубок, используя пуллер микропипеток P-97 (Sutter Instruments, Новато, Калифорния). Коммерческий усилитель для метода фиксации потенциала использовали для записи целых клеток. До оцифровки низкие частоты - одну пятую от частоты замеров - отфильтровывали от записи токов.

Начальное и устойчивое подавление тока hERG измеряли с использованием импульсной схемы с фиксированными амплитудами (подготовительный предварительный импульс: +20 мВ в течение 2 с; тестовый импульс: -50 мВ в течение 2 с), повторяемой с интервалами 10 с, с исходным потенциалом -80 мВ. Пиковый следовой ток измеряли в течение 2 с до -50 мВ.

Одну концентрацию испытуемого образца применяли для каждой клетки (n = 3). Пиковый ток измеряли во время тестового линейного изменения. Устойчивое состояние поддерживалось в течение не менее 30 с перед применением испытуемого образца или положительного контроля. Пиковый ток измеряли до достижения нового устойчивого состояния. Результаты приведены в табл. 2.

Данные по пероральной биодоступности для крыс собирали следующим образом.

Результаты приведены в табл. 2.

Линия крыс/пол: Спрег-Доули/самцы.

Возраст/масса тела: от 6 до 8 недель/250-300 г.

Количество животных на группу: n = 3.

Общее количество групп: 2 (1 мг/кг ИВ и 10 мг/кг РО).

Способ введения: перорально (РО)/внутривенно (ИВ).

Объем дозирования: внутривенно (2 мл/кг) и перорально (10 мл/кг).

Носители состава: стандартные составы или предложенные спонсором.

Величина дозы (ИВ и РО): 1 мг/кг внутривенно; 10 мг/кг перорально или как предложено.

Натощак/после еды (англ. Fast/Fed): пероральная доза вводится животным, не евшим в течение ночи.

Частота дозирования: разовая доза.

Временные точки для забора крови: (57 образцов плазмы для анализа).

ИВ - 10 точек (предварительная доза; 5 мин; 15 мин; 30 мин; 1 ч; 2 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 24 ч) [n = 3 крысы].

РО - 9 точек (предварительная доза; 15 мин; 30 мин; 1 ч; 2 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 24 ч) [n = 3 крысы].

Сбор образцов крови: канюля ярёной вены.

Антикоагулянт: 0,2% K2 ЭДТА.

Анализ образцов биоаналитическим методом для исследований, разработанным для оценки испытуемого соединения в плазме системой LC-MS/MS.

Таблица 2

		Соединение 1	Соединение сравнения А	Соединение сравнения Б
SK2 активность (SC_{100}) ^a	400 нМ	1380 нМ	5800 нМ	
Свободная фракция в головном мозге ^a	6,1%	1,2%	NA	
Кинетическая растворимость (мг/мл)	0,074	0,017	NA	
Стабильность в микросомах печени [†]	Мышь	47%	1%	NA
	Крыса	60%	1%	NA
	Собака	54%	2%	NA
	Обезьяна	46%	1%	NA
	Человек	84%	50%	NA
Ингибирование CYP1A2 (IC_{50})	> 10 мкМ	640 нМ	NA	
Ингибирование CYP3A4 (IC_{50})	> 10 мкМ	> 10 мкМ	NA	
Ингибирование CYP2D6 (IC_{50})	> 10 мкМ	790 нМ	NA	
Ингибирование hERG (IC_{50})	> 10 мкМ	> 10 мкМ	NA	
Пероральная биодоступность [§]	81%	5%	NA	

SC_{100} = концентрация, которая вызывает удвоение тока канала.

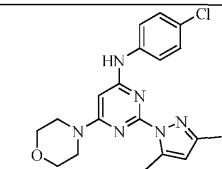
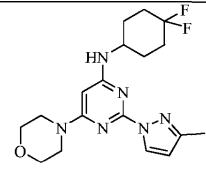
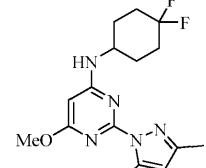
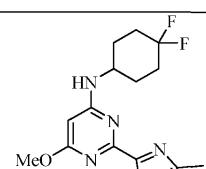
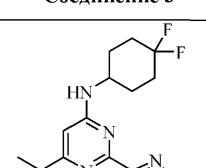
^a Небольшое расхождение в значениях по сравнению с предыдущей таблицей из-за незначительных различий в средних показателях, взятых из более поздних экспериментов.

[†] оставшийся % через 1 ч.

[§] 10 мг/кг РО, 0,5 мг/кг ИВ для крыс.

Как видно из данных в табл. 2 выше, соединение 1 проявляет более чем в 3 раза большую активность к SK2, чем соединение сравнения А, и более чем в 14 раз большую активность к SK2, чем соединение сравнения Б. Соединение 1 также имеет лучшую растворимость, более высокую свободную фракцию в головном мозге (Brain Free Fraction, BFF), более высокую микросомальную стабильность и более высокую пероральную биодоступность, чем у соединения сравнения А. Общее улучшение BFF и растворимости по сравнению с соединением сравнения А и фенильным производным соединением сравнения В также было продемонстрировано для соединений, описанных в настоящем изобретении, как показано в табл. 3. Данные для соединения 1 приводятся ещё раз для удобства сравнения.

Таблица 3

	Свободная фракция в головном мозге	Кинетическая растворимость (мг/мл)
 Соединение сравнения В	0,16%	0,001
 Соединение 1	6,1%	0,074
 Соединение 2	2,76%	0,031
 Соединение 3	2,69%	0,0709
 Соединение 5	4,20%	0,0803
 Соединение 6	4,31%	0,0667
 Соединение 7	1,55%	0,0497

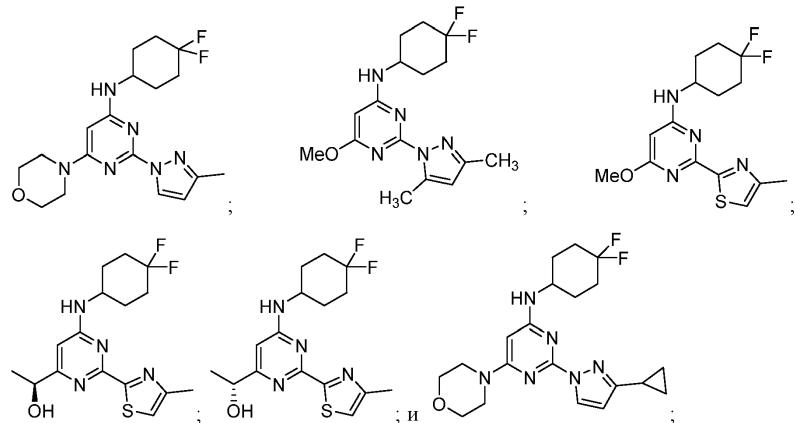
Хотя мы и описали несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, очевидно, что наши основные примеры могут быть изменены, чтобы обеспечить другие варианты осуществления настоящего изобретения, в которых используются соединения и способы настоящего изобретения. Следовательно, следует понимать, что объем настоящего изобретения задаётся прилагаемой формулой изобретения, а не конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения, которые были представле-

ны в качестве примера.

Содержание всех ссылочных материалов (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно рассматриваемые патентные заявки), процитированные в настоящей заявке, настоящим полностью включены в изобретение посредством ссылки. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, соответствуют значению, общезвестному специалисту в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

3. Способ лечения заболевания или состояния, реагирующего на модуляцию кальций-зависимого калиевого канала малой проводимости (канал SK), у нуждающегося в этом субъекта, включающий стадию введения субъекту соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли или композиции по п.2.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что заболевание или состояние является реакцией на модуляцию канала SK2.

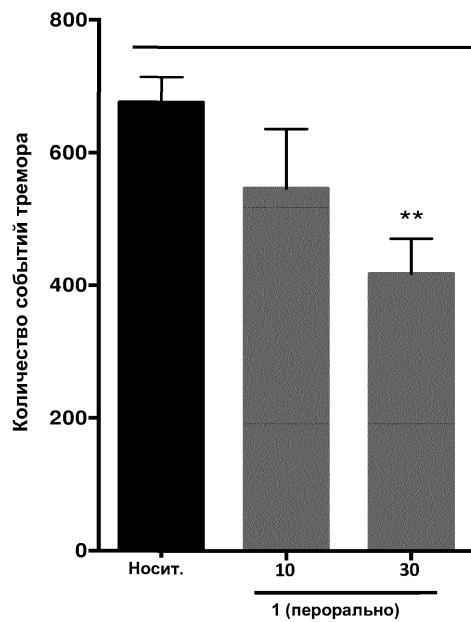
5. Способ по п.3, отличающийся тем, что заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из нейродегенеративного заболевания, деменции, заболевания сердца, абстинентных симптомов, связанных с прекращением зависимости, метаболического заболевания и заболевания мочевого пузыря.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из атаксии, дистонии, tremora, болезни Паркинсона, ишемии, черепно-мозговой травмы, бокового амиотрофического склероза, гипертонии, атеросклероза, диабета, аритмии, гиперактивности мочевого пузыря и симптомов абстиненции, вызванных прекращением злоупотребления алкоголем и другими наркотическими веществами.

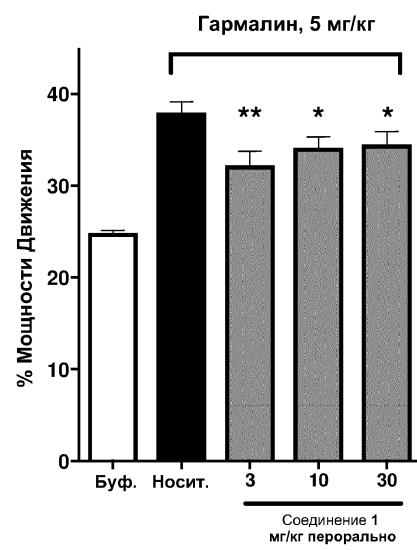
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что заболевание или состояние является эссенциальным трепмором.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что заболевание или состояние является атаксией.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что заболевание или состояние является спиноцеребеллярной атаксией.

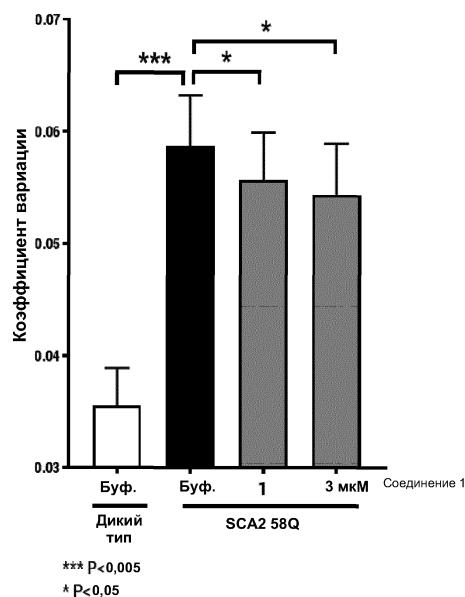


ФИГ. 1

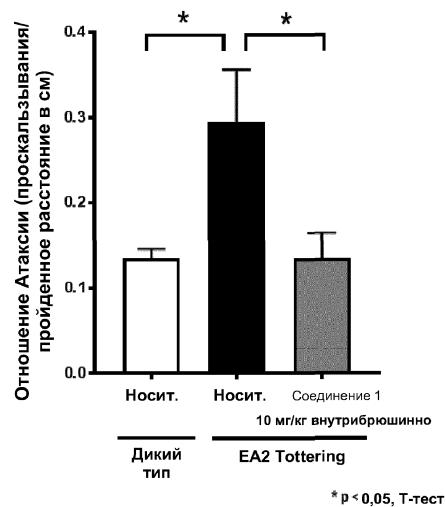


ФИГ. 2

* $p < 0,05$, T-тест** $p < 0,01$, T-тест



Фиг. 3



Фиг. 4

