



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110724** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61P 27/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

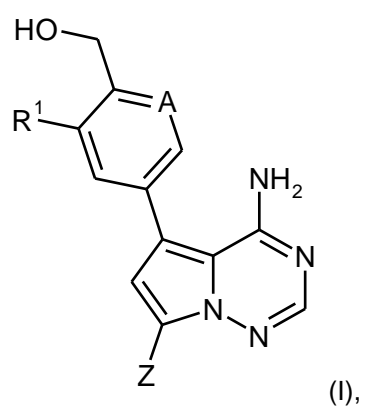
**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 00937</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Клар Юрген (DE), Фьорінгер Верена (DE), Тельзер Йоахім (DE), Лобелль Маріо (DE), Зюсмаєр Франк (DE), Лі Фолькхарт Мін-Джян (DE), Бьоттгер Міхаель (DE), Гольц Штефан (DE), Ланг Дітер (DE), Шлеммер Карл-Хайнц (DE), Шланге Томас (DE), Шалль Андреас (DE), Фу Венланг (CN/US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>26.06.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.02.2016</b>	
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/503,840, 12161547.0</b>	
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>01.07.2011, 27.03.2012</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, EP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.04.2014, Бюл.№ 7</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>БАЄР ІНТЕЛЛЕКЧУЕЛ ПРОПЕРТІ ГМБХ,</b> Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789 Monheim, Germany (DE), <b>БАЄР ФАРМА АКЦІЕНГЕЗЕЛЬШАФТ,</b> Müllerstrasse 178, Berlin 13353, Germany (DE)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.02.2016, Бюл.№ 3</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/EP2012/062366, 26.06.2012</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Пахаренко Олександр Володимирович,</b> реєстр. №136
	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 1873 157 A1; 02.01.2008 WO 2007/061882 A2; 31.05.2007 WO 00/71129 A1; 30.11.2000

**(54) ГІДРОКСИМЕТИЛАРИЛЗАМІЩЕНІ ПІРОЛОТРИАЗИНИ ЯК ІНГІБІТОРИ ALK1****(57) Реферат:**

Цей винахід стосується нових 5-[(гідроксиметил)арил]-заміщених піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амінів, способів одержання таких сполук, фармацевтичних композицій, що містять такі сполуки, та застосування таких сполук або композицій для лікування ангіогенез-опосередкованих розладів, зокрема ангіогенез-опосередкованих очних розладів.

**UA 110724 C2**



Цей винахід стосується нових 5-[(гідроксиметил)арил]-заміщених піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амінів, способу одержання таких сполук, фармацевтичних композицій, що містять такі сполуки, та застосування таких сполук або композицій для лікування ангіогенез-опосередкованих розладів, зокрема, ангіогенез-опосередкованих очних розладів.

5 Термін ангіогенез, який також називають неоваскуляризацією, означає процес формування нових кров'яних судин. Він приймає участь у нормальному розвитку, а також різноманітних патологічних станах, включаючи, наприклад, рак, ревматоїдний артрит, загоєння рани після пошкодження тканини, атеросклероз, псоріаз, та захворювання очей.

10 Різноманітні захворювання очей, які відповідають за більшу частину захворювань зору та сліпоту у розвинутих країнах характеризуються, викликаються та/або викликають хороїдальну, ретинальну або радужну неоваскуляризацію або ретинальну едему [Campochiaro (2004), Exp. Opin. Biol. Ther. 4: 1395-1402].

15 Наприклад, ретинопатія, пов'язана з діабетом, є найважливішою причиною сліпоти при діабеті типу 1, а також зазвичай присутня при діабеті типу 2. Інший очний розлад, що бере участь у неоваскуляризації означає вік-опосередковану макулярну дистрофію (AMD). AMD є найпоширенішою причиною втрати зору у західному світі у тих, кому 50 або старше, та її частота збільшується з віком. AMD класифікують як вологу (неоваскулярну) або суху (не-неоваскулярну). Волога форма захворювання відповідає за найбільш значну втрату зору.

20 Деякі інші менш поширені, проте тим не менш послаблюючі ретинопатії включають хороїдальна неоваскулярна мембрана (CNVM), кістозний макулярний набряк (CME, також називають макулярний набряк або макулярна опухлість), епі-ретинальна мембрана (ERM, синдром макулярної складки), та розрив сітківки. У CNVM, аномальні кров'яні судини, що беруть начало з судинної оболонки ока, ростуть крізь шари сітківки. Крихіткі нові судини легко руйнуються, що викликає накопичення крові та рідини всередині шарів сітківки. У CME, який  
25 може з'явитись внаслідок захворювання, пошкодження або хірургічного втручання, рідина збирається всередині макулярних шарів, викликаючи розпливчастий, перекошений центральний зір. ERM (синдром макулярної складки) є целофано-подібною мембраною, що утворюється поверх жовтої плями, уражуючи центральний зір шляхом викликання розмитості та перекошення.

30 Також сюди відносяться розлади, такі як гіпертонічні та атрофічні зміни пігментного епітелію сітківки (РПЕ), відшарування сітківки, хороїдальна закупорка вен, закупорка вен сітківки, корнеальний ангіогенез після, наприклад, кератиту, трансплантації роговиці або кератопластики, корнеальний ангіогенез внаслідок гіпоксії (наприклад, в результаті надмірного вживання контактних лінз), крилоподібна плева кон'юнктиви, субретинальний набряк, та  
35 інтраретинальний набряк.

Виявили, що фактор росту ендотелію судин (VEGF) є важливим модулятором ангіогенезу та бере участь у патології різноманітних станів, включаючи AMD та діабетичну ретинопатію. Більш того, для AMD показали, що інтравітреальна ін'єкція інгібітора анти-VEGF, такого як пегабтаніб, ранібізумаб або афліберцепт зменшує хороїдальний ангіогенез та транссудацію [Gragoudas  
40 (2004), N. Engl. J. Med. 351: 2805-2816; Rosenfeld (2006), N. Engl. J. Med. 355: 1419-1431; Dixon (2009), Expert Opin. Investig. Drugs 18: 1573-1580].

Сучасним стандартом для лікування AMD є луцентіс (ранібізумаб), анти-VEGF терапія. Однак, лише 1/3 всіх пацієнтів з AMD, яких лікували луцентісом, показали покращення зору [Rosenfeld (2006), N. Engl. J. Med. 355: 1419-1431]. Тому, нові анти-ангіогенні терапевтичні  
45 засоби з VEGF-незалежним шляхом дії мають потенціал для покращення сучасного стандарту лікування захворювань, таких як діабетична ретинопатія та AMD.

ALK1 (активін-подібна кіназа-1) є рецептором Ser/Thr кінази з TGFβ родини рецепторів, які головним чином експресуються у ендотеліальних клітинах та беруть участі у ангіогенезі. Члени цієї родини здійснюють свою біологічну активність шляхом зв'язування ліганда з гетеромерним  
50 рецепторним комплексом типу I та типу II рецепторів серин/треонін кінази TβRI та TβRII та рецепторів допоміжного типу III. TGFβ а також високо афінні ліганди BMP9 та BMP10 можуть активувати ALK1 в рецепторних комплексах з BMPRII або ActRII та рецептором ендогліну типу III [Scharpfenecker (2007), J. Cell Sci. 120: 964-972]. Зв'язування BMP9 з ALK1 в капілярних ендотеліальних клітинах активує шлях Smad1/5/8 [David (2007), Blood 109 (5): 1953-1961].  
55 Вважалось, що BMP9 інгібує міграцію та ріст ендотеліальних клітин. Більшість досліджень, однак, виявила, що активацію рецептора ALK1 стимулює міграцію, проліферацію та утворення трубки ендотеліальними клітинами [Goumans (2002), EMBO Journal 21 (7): 1743-1753; Wu (2006), Microvasc. Res. 71: 12-19].

60 BMP9 та BMP10 активують рецепторні комплекси ALK1. В ендотеліальних клітинах, TGFβ також може активувати ALK1, у той час як у більшості типів клітин TGFβ передає сигнал через

ALK5. Активація ALK5 приводить до фосфорилування Smad2/3, у той час як активація ALK1 приводить до фосфорилування Smad1/5. Кожен сигнальний шлях Smad в результаті приводить до регулювання конкретного набору генів-мішеней: Сигнальний шлях Smad2/3 викликає експресію PAI-1 та пригнічення Id-1, у той час як сигнальний шлях Smad1/5 викликає експресію Smad6, Smad7 та Id-1 та пригнічення експресії PAI-1 [Deng (2006), J. Cell Biol. 134: 1563-1571; Ota (2002), J. Cell Physiol. 193: 299-318].

Рецептор ендогліну типу III відіграє роль точного регулятора сигнальних шляхів ALK1 та ALK5, особливо, в ендотеліальних клітинах, шляхом регулювання взаємодії ліганд-рецептор [ten Dijke (2008), Ангіогенез 11: 79-89]. Ендоглін допомагає TGF $\beta$ /ALK1-взаємодії, проте пригнічує TGF $\beta$ /ALK5-взаємодію [David (2007), Blood 109: 1953-1961].

Мутації в ендогліні та в ALK1 пов'язані з аутосомальним домінантним розладом, що називається спадкова геморагічна телеангіектазія (HHT1 та HHT2, відповідно) з характеристиками ангіогенного розладу, такими як артеріовенозна мальформація та телеангіектазія [Fernandez-Lopez (2006), Clin. Med. & Res. 4: 66-78]. Миші RIP1-Tag2 з тільки однією функціональною копією гена ALK1 (ALK1<sup>+/-</sup>) показали затримку росту пухлини та меншу щільність капілярів, порівняно з мишами ALK1<sup>wt</sup>. Подібні спостереження здійснювали з розчинним ALK1-Fc рецепторним конструктором RAP-041, що пригнічував ангіогенез пухлини *in vivo* та обмежував ріст пухлини [Cunha (2010), J. Exp. Med. 207: 85-100].

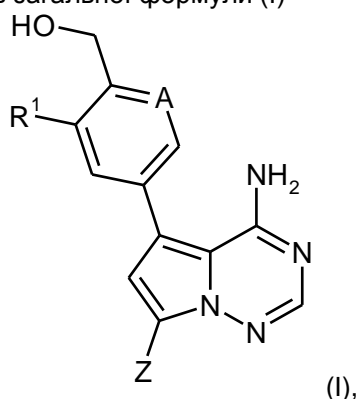
Розробка сильнодіючих та селективних інгібіторів ALK1 є таким чином дуже бажаним для подальшого виявлення ролі ALK1 у фізіології та патології кров'яних судин, та для одержання потенційних терапевтичних засобів для захворювань, пов'язаних з ангіогенезом та реконструкцією судин.

У WO 2007/147647-A1, описані певні 3-арил-заміщені похідні піразоло[1,5-а]піримідину, що є першими дрібно молекулярними інгібіторами кінрази ALK1, опублікованій на той час. Вказано, що ці сполуки є придатними для лікування захворювань нерегульованого росту судин, зокрема, твердих пухлин та їх метастазів, а також ангіогенез-залежних захворювань очей, таких як вікопосередкована макулярна дистрофія.

Різноманітні похідні піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну з чіткими профілями інгібування проти діапазону протеїнкіназ описані у, *inter alia*, WO 00/71129-A1, WO 2005/121147-A1, WO 2007/056170-A2, WO 2007/061882-A2, WO 2007/064883-A2, WO 2007/064931-A2, WO 2007/079164-A2, WO 2008/089105-A2, WO 2009/136966-A1 та WO 2010/126960-A1. Зазвичай, зазначали, що ці сполуки є придатними для лікування проліферативних та/або ангіогенез-опосередкованих розладів, таких як рак. Жодна з цих публікацій, однак, не стосується ALK1 як потенційної кінрази мішені.

Неочікувано, було виявлено, що похідні піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну, що мають замісник гідроксиметиларил у 5-положенні проявляють значне та селективне інгібування ALK1 кінрази, що робить ці сполуки особливо бажаними для лікування ангіогенез-опосередкованих розладів очей.

Таким чином, у одному аспекті, даний винахід стосується 5-[(гідроксиметил)арил]-заміщених піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амінів загальної формули (I)



де

A означає N або C-R<sup>2</sup>, де

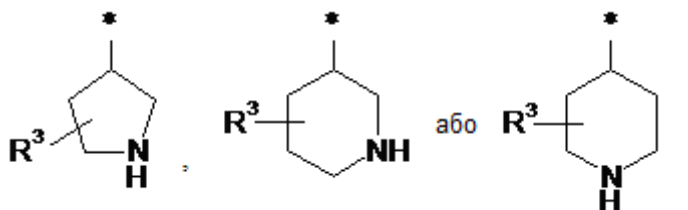
R<sup>2</sup> означає водень, фтор або хлор,

R<sup>1</sup> означає водень, фтор, хлор, метил, етил або метокси,

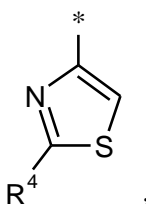
та

Z означає (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-алкіл або (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-циклоалкіл, кожен з яких може бути заміщеним гідрокси, або

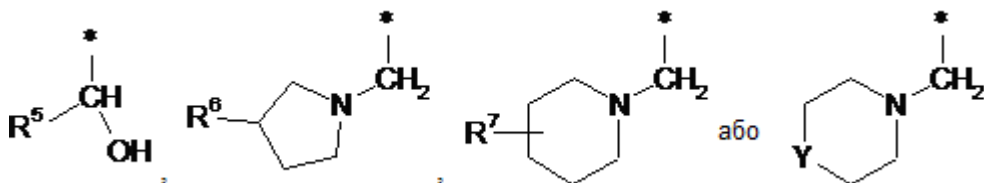
Z означає гетероциклічну групу формули



- де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та  
R³ означає водень або гідрокси,  
5 при умові, що коли R³ означає гідрокси, цей гідрокси не є приєднаним до атому вуглецю кільця, розташованого поряд з атомом азоту кільця,  
або  
Z означає триазол формули



- 10 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та  
R⁴ означає водень, метил, етил, аміно або амінометил,  
або  
Z означає групу формули



- 15 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
R⁵ означає (C₃-C₆)-циклоалкіл, оксетаніл, тетрагідрофураніл або тетрагідропіраніл,  
R⁶ означає водень або гідрокси,  
R⁷ означає водень або гідрокси,  
20 при умові, що коли R⁷ означає гідрокси, цей гідрокси не є приєднаним до атому вуглецю кільця, розташованого поряд з атомом азоту кільця,  
та  
Y означає O, NH або NCH₃.

- 25 Сполуки цього винаходу також можуть бути присутніми у формі їх солей, сольватів та/або сольватів солей.

- Сполуки цього винаходу є сполуками формули (I) та їх солями, сольватами та сольватами солей, сполуками включеними у формулу (I) та згаданими далі та їх солями, сольватами та сольватами солей, та сполуками включеними у формулу (I) та згаданими далі як приклади варіантів втілення та їх солями, сольватами та сольватами солей, де сполуки включені у формулу (I) та згадані далі ще не є солями, сольватами та сольватами солей.

- 30 Солі для цілей даного винаходу бажано є фармацевтично прийнятними солями сполук винаходу (наприклад, дивитись S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19). Солі, що самі по собі не є придатними для фармацевтичного застосування, проте можуть бути використані, наприклад, для виділення або очистки сполук винаходу також є включеними.

- 35 Фармацевтично прийнятні солі включають кислотні адитивні солі неорганічних кислот, карбонових кислот та сульфонових кислот, наприклад солі хлорводневої кислоти, бромводневої кислоти, сірчаної кислоти, фосфорної кислоти, метансульфонові кислоти, етансульфонові кислоти, бензолсульфонові кислоти, толуолсульфонові кислоти, нафталендисульфонові кислоти, оцтової кислоти, пропіонової кислоти, молочної кислоти, винної кислоти, яблучної кислоти, лимонної кислоти, фумарової кислоти, малеїнової кислоти та бензойної кислоти.

- 40 Сольвати в контексті винаходу позначені як ті форми сполуки винаходу, що утворюють комплекс в твердому або рідкому стані шляхом стехіометричної координації з молекулами

розчинника. Гідрати є конкретною формою сольватів, в яких координація здійснюється з водою. Гідрати є бажаними сольватами в контексті даного винаходу.

Сполуки цього винаходу можуть, або за природою асиметричних центрів або за обмереженням обертанням, знаходитись у формі ізомерів (енантіомерів, діастереомерів). Будь-який ізомер може бути присутнім, у якому асиметричний центр знаходиться у (R)-, (S)- або (R,S)-конфігурації.

Також бажано, коли два або кілька асиметричних центри наявні у сполуці винаходу, декілька діастереомерів та енантіомерів представлених структур часто є можливими, та бажані варіанти втілення представлені чистими діастереомерами та чистими енантіомерами. Передбачається, що чисті стереоізомери, чисті діастереомери, чисті енантіомери, та їх суміші, входять у рамки винаходу.

Геометричні ізомери за природою замісників біля подвійного зв'язку або кільця можуть знаходитись у цис (= Z-) або транс (= E-) формі, та обидві ізомерні форми є включеними у рамки даного винаходу.

Всі ізомери, чи виділені, чисті, частково очищені або у рацемічній суміші, сполук цього винаходу є включеними у рамки даного винаходу. Очистку вказаних ізомерів та розділення вказаної рацемічної суміші здійснюють за відомими у галузі способами. Наприклад, діастереомерні суміші можуть бути розділені на окремі ізомери хроматографією або кристалізацією, та рацемати можуть бути розділені на відповідні енантіомери хроматографією на хіральній фазі або розчиненням.

Також, всі можливі таутомерні форми вищеописаних сполук є включеними у рамки даного винаходу.

Доки не зазначено протилежне, наступні значення наводять для замісників та залишків, використані по всьому опису та формулі:

(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-алкіл означає з прямим ланцюгом або розгалужений насичений вуглеводневий радикал, що має 1-4 атоми вуглецю. Приклади включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор.-бутил, трет-бутил.

(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-циклоалкіл означає моно циклічний насичений вуглеводневий радикал, що має 3-6 кільцевих атомів вуглецю. Приклади включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил.

По цьому документу, з метою спрощення, застосуванню однини надають перевагу над множиною, проте зазвичай множинні значення також є включеними, доки не вказано протилежне. Наприклад, вираз "Спосіб лікування захворювання у пацієнта, що включає введення пацієнту ефективної кількості сполуки формули (I)" включає одночасне лікування більш ніж однієї хвороби, а також введення більш ніж однієї сполуки формули (I).

У бажаному варіанті втілення, даний винахід стосується сполук загальної формули (I), де

A означає C-R<sup>2</sup>, де

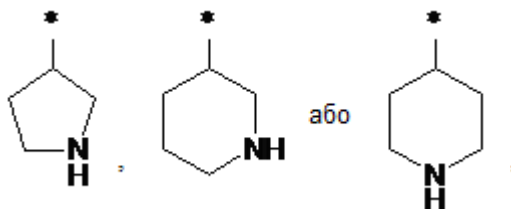
R<sup>2</sup> означає водень або фтор,

R<sup>1</sup> означає водень, фтор, хлор, метил, етил або метокси,

та

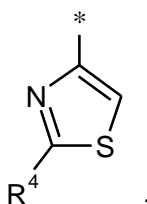
Z означає н-пропіл, н-бутил або циклогексил, кожен з яких може бути заміщеним гідрокси, або

Z означає гетероциклічну групу формули



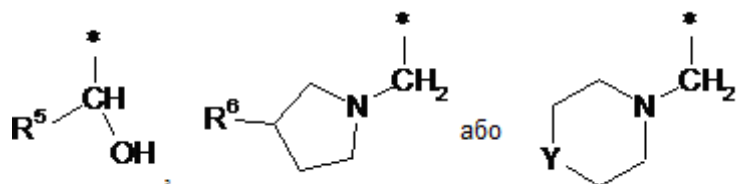
де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку, або

Z означає триазол формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та  
R<sup>4</sup> означає метил, етил, аміно або амінометил,  
або

5 Z означає групу формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
R<sup>5</sup> означає циклопропіл або тетрагідропіран-4-іл,  
R<sup>6</sup> означає гідрокси,

10 та  
Y означає O.

У особливо бажаному варіанті втілення, даний винахід стосується сполук загальної формули (I), де

A означає C-R<sup>2</sup>, де

15 R<sup>2</sup> означає водень або фтор,

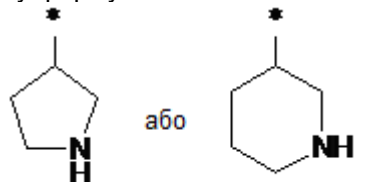
R<sup>1</sup> означає водень, фтор, метил, етил або метокси,

та

Z означає 4-гідроксибутил або 4-гідроксициклогексил,

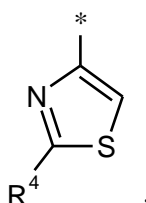
або

20 Z означає гетероциклічну групу формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
або

Z означає триазол формули



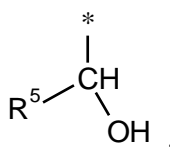
25

де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та

R<sup>4</sup> означає метил, етил, аміно або амінометил,

або

30 Z означає групу формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та

R<sup>5</sup> означає циклопропіл.

35 У конкретному варіанті втілення, даний винахід стосується сполук загальної формули (I), де

A означає C-R<sup>2</sup>, де

R<sup>2</sup> означає водень або фтор.

У іншому конкретному варіанті втілення, даний винахід стосується сполук загальної

формули (I), де

A означає C-R<sup>2</sup>, де

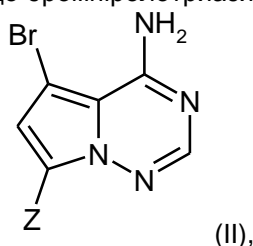
R<sup>2</sup> означає фтор,

та

R<sup>1</sup> означає фтор.

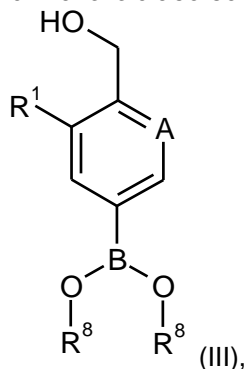
Визначення залишків конкретно вказані у відповідних комбінаціях або бажаних комбінацій залишків можуть бути замінені у разі потреби визначеннями залишків інших комбінацій, незалежно від певних комбінацій, зазначених для залишків. Комбінації двох або більше вищенаведених бажаних діапазонів є особливо бажаними.

У іншому варіанті втілення, даний винахід стосується способу одержання сполуки загальної формули (I), який відрізняється тим, що бромпіролотриазин формули (II)



де Z має вищенаведене значення,  
є або

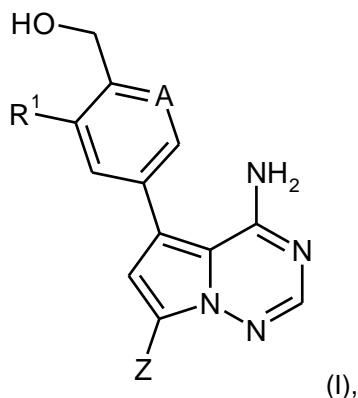
[A] конденсованим з арилбороновою кислотою або естером формули (III)



де A та R<sup>1</sup> мають вищенаведені значення,  
та

R<sup>8</sup> означає водень або (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-алкіл, або обидва залишки R<sup>8</sup> зв'язані разом з утворенням - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- або -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- містка,

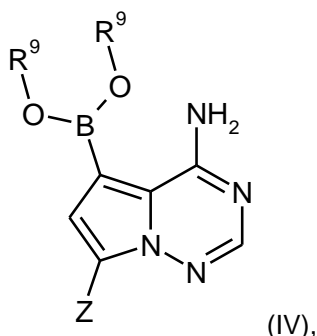
в присутності придатного каталізатора паладію та основи з одержання потрібної сполуки формули (I)



де A, Z та R<sup>1</sup> мають вищенаведені значення,  
або

[B] спочатку перетвореним на відповідну похідну боронової кислоти або естеру формули (IV)

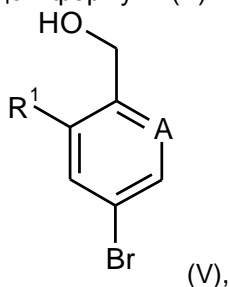




де Z має вищенаведене значення,

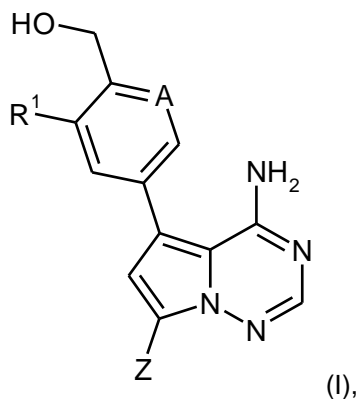
та

5  $R^9$  означає водень або  $(C_1-C_4)$ -алкіл, або обидва залишки  $R^9$  зв'язані разом з утворенням - $(CH_2)_2$ -,  $-C(CH_3)_2-C(CH_3)_2$ -,  $-(CH_2)_3$ - або  $-CH_2-C(CH_3)_2-CH_2$ - містка, яку потім конденсують з арилбромідом формули (V)



де A та  $R^1$  мають вищенаведені значення,

10 в присутності придатного каталізатора паладію та основи з одержанням бажаної сполуки формули (I)



де A, Z та  $R^1$  мають вищенаведені значення,

необов'язково після чого, у разі потреби, шляхом (i) розділення сполук формули (I) на їх відповідні енантіомери та/або діастереомери, бажано використовуючи способи хроматографії, 15 та/або (ii) перетворення сполук формули (I) на їх відповідні гідрати, сольвати, солі та/або гідрати або сольвати солей шляхом обробки відповідними розчинниками та/або кислотами.

Як зазначено вище, сполуки формули (I) можуть бути синтезовані шляхом конденсації ("конденсація Сузукі") між бромпіролотриазином (II) та арил боронатом або бороною 20 кислотою (III). Це конденсування зазвичай здійснюють при підвищеній температурі, використовуючи каталізатор паладію, основу або інертний розчинник. Огляд каталізаторів та умов реакції можна знайти в літературі [дивитись, наприклад, S. Kotha et al., Tetrahedron 2002, 58, 9633-9695; T.E. Barder et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4685-4696]. Бажаним каталізатором в цій реакції є тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0). Бажаною основою є карбонат натрію, застосований як водний розчин. Реакцію здійснюють у органічних розчинниках, 25 що є інертними в умовах реакції, таких як 1,4-діоксан, ацетонітрил, N,N-диметилформамід (ДМФ) або диметилсульфоксид (ДМСО), або у воді або у сумішах цих розчинників. Бажано, реакцію здійснюють у суміші 1,4-діоксану та води або ацетонітрилу та води. Реакцію зазвичай здійснюють при температурах від +100 °C до +250 °C, бажано від +120 °C до +150 °C. Нагрівання бажано здійснюють у одно-модовій мікрохвильовій пічці. Реакції зазвичай 30 перебігають в атмосфері інертного газу, бажано аргону.

Зворотня реактивність реакційних партнерів для конденсації Сузукі може іноді бути

бажаною. Для цієї мети, бромпіролотриазин (II) спочатку перетворюють на відповідний боронат (IV) та потім крос-конденсують з арил бромідом (V) згідно з одним з вищеописаних способів. Перетворення (II) - (IV) досягають метал-опосередкованою реакцією борилювання. Бажаним способом є паладій-каталізоване "борилювання Міяура" [дивитись, наприклад, J. Takagi et al., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 8001-8006; T. Ishiyama et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 7508-7510; A. L. S. Thompson et al., Synthesis 2005, 547-550]. Процедури, реагенти та розчинники для реакції крос-конденсування (IV) + (V)  $\rightarrow$  (I) вибирають з тих, що наведені у попередніх секціях.

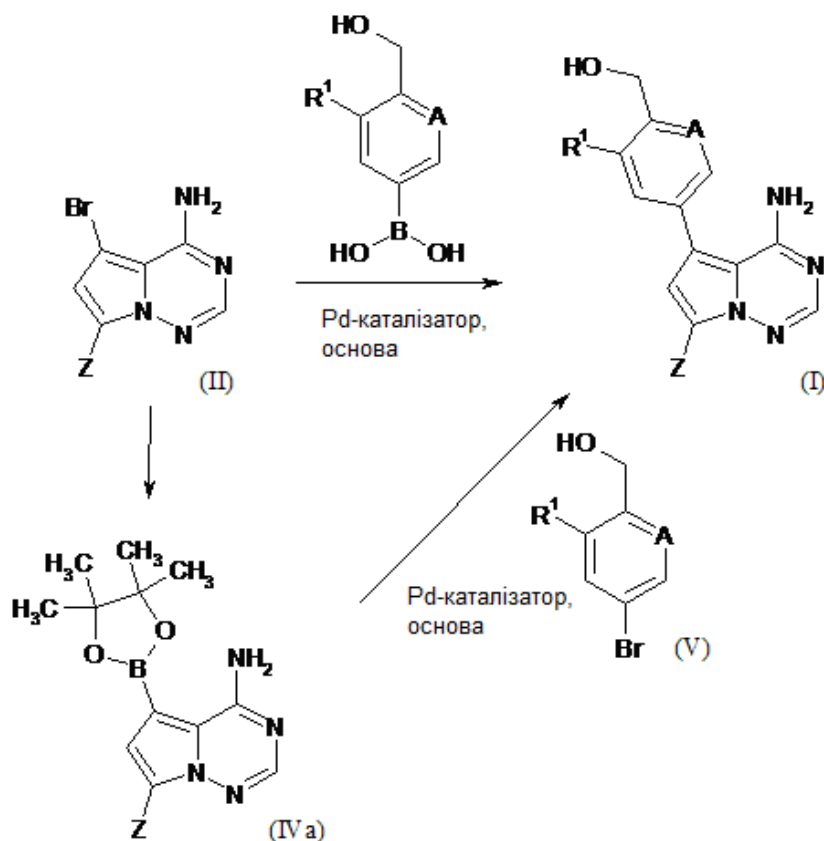
Арилборонові кислоти (III) [ $R^8=H$ ] та арилборонати (III) [ $R^8$  = алкіл, або обидва  $R^8$  зв'язані разом з утворенням циклічного боронового естеру, наприклад, пінаколінового естеру] є або наявними на ринку, або їх можна одержати з відповідних арил галідів або арил три флатів, використовуючи метал-опосередковану реакцію борилювання (з метою посилення, дивитись попередній розділ). Борилювання та наступну конденсацію Сузукі можна здійснювати у дві окремі стадії, включаючи виділення та очистку проміжної сполуки (III). Альтернативно, борилювання та крос-конденсацію можна здійснювати як одно-стадійну процедуру, використовуючи (III) напряму без виділення та очистки.

У випадках, коли залишок первинного або вторинного аміну утворює частину групи Z у сполуці мішені формули (I), зазвичай є бажаним при вищеописаних борилюванні та конденсації використовувати захищену похідну цього аміну, як вихідний піролотриазин (II) замість вільного аміну. Для цієї мети, можна використовувати звичайні тимчасові аміно-захисні групи, такі як ацильні групи (наприклад, ацетил або трифторацетил) або захисні групи карбаматного типу (наприклад, Boc-, Cbz- або Fmoc-група). Бажано, використовують трифторацетил або Boc групу. Аналогічно, гідрокси функція в компонентах конденсації (III) та (V), відповідно, може бути тимчасово заблокована протягом реакції, бажано як похідна силілового етеру, такого як триметилсиліловий або трет-бутилдиметилсиліловий етер.

Ці захисні групи можуть потім бути відщеплені протягом водної обробки реакційних сумішей конденсації, або їх видаляють у наступній окремій стадії, використовуючи стандартні способи. Одержання захищених вищеописаних проміжних сполук з відповідних вільних амінів або спиртів формули (II), (III) та (V), відповідно, або з іншого попередника сполуки (дивитись розділ нижче) також легко здійснюють за звичайними процедурами, описаними у літературі [дивитись, наприклад, T.W. Greene and P. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1999].

Одержання сполуки винаходу може бути проілюстровано за наступною схемою синтезу:

Схема 1



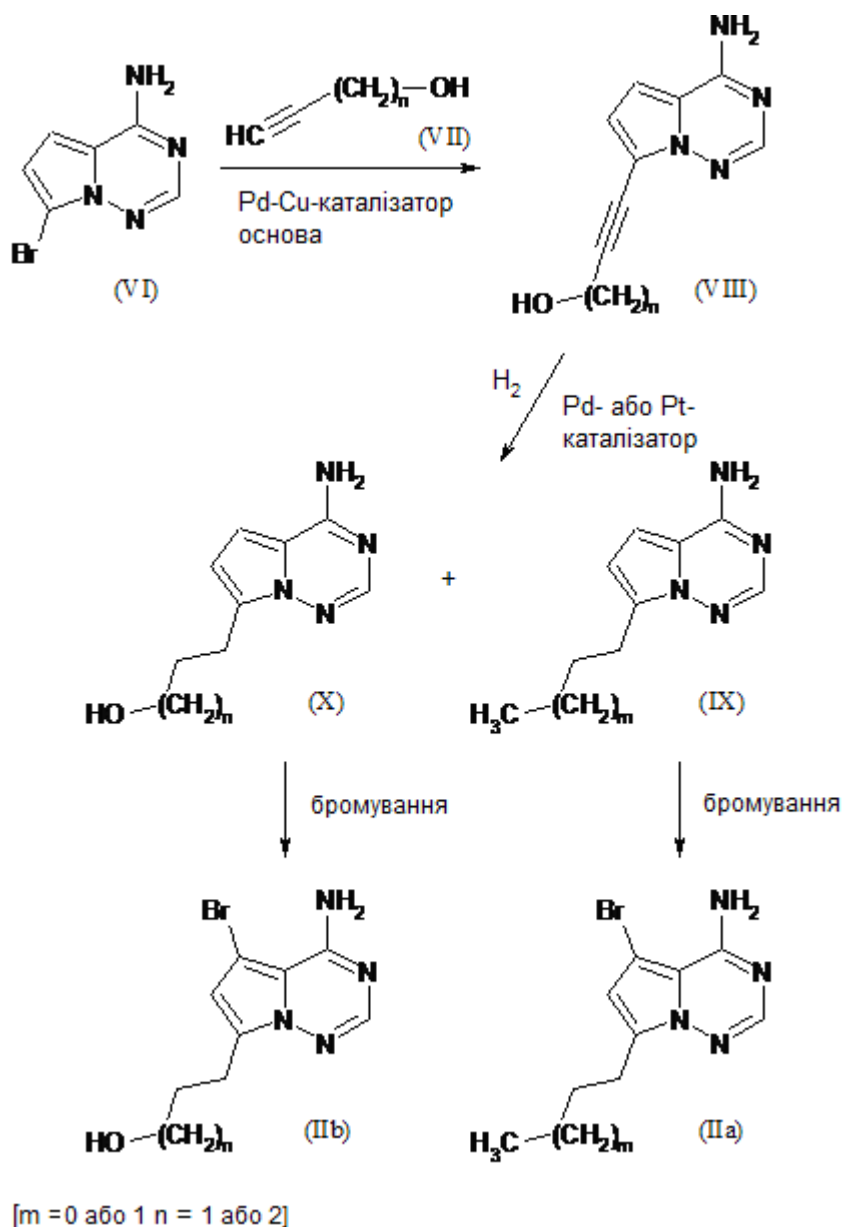
5       Методики синтезу, що можуть бути використані для одержання бромпіролотриазинів формули (II), можуть бути структуровані відповідно до гемотипу Z групи, наявної у (II). Приклади, що ілюструють ці різні шляхи, наведені нижче (дивитись схеми синтезу 2-6). Більш детально процедури наведені у Експериментальній частині, що описує конкретні проміжні сполуки та приклади сполук винаходу.

10       Наприклад, сполуки формули (II), що містять алкільний або гідроксyalкільний залишок як Z групу, можуть бути одержані шляхом застосування реакції конденсації між бромпіролотриaziном (VI) та кінцевим алкіном формули (VII) як ключової стадії (схема 2). Цей тип реакції ("реакція Соногашири") зазвичай здійснюють в присутності системи каталізаторів паладій-мідь та основи. Декілька прикладів цієї реакції описані в літературі [дивитись, наприклад, R. Chinchilla and C. Nájera, Chem. Rev. 2007, 107, 874-922]. У даному винаході, бажаним джерелом міді є йодид міді(I), тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0), використовують як каталізатор паладію, та піролідин слугує як основою, так і розчинником. Реакцію конденсації переважно здійснюють при супутньому мікрохвильовому опроміненні.

20       Одержаний алкін (VIII) потім піддають каталітичному гідруванню, застосовуючи звичайний каталізатор паладію або платини. Бажано, оксид платини (IV) використовують як каталізатор, та реакція проходить у оцтовій кислоті як розчиннику. В деяких випадках, суміш продуктів (IX) та (X) одержують за цією методикою, яка, у будь-якому випадку, може бути розділена за способами хроматографії. Наступну реакцію бромкування здійснюють, бажано використовуючи 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн як джерело бром, у інертному розчиннику, такому як ТГФ або ДМФ, з одержанням потрібних піролотриазинів (IIa) та (IIb), відповідно.

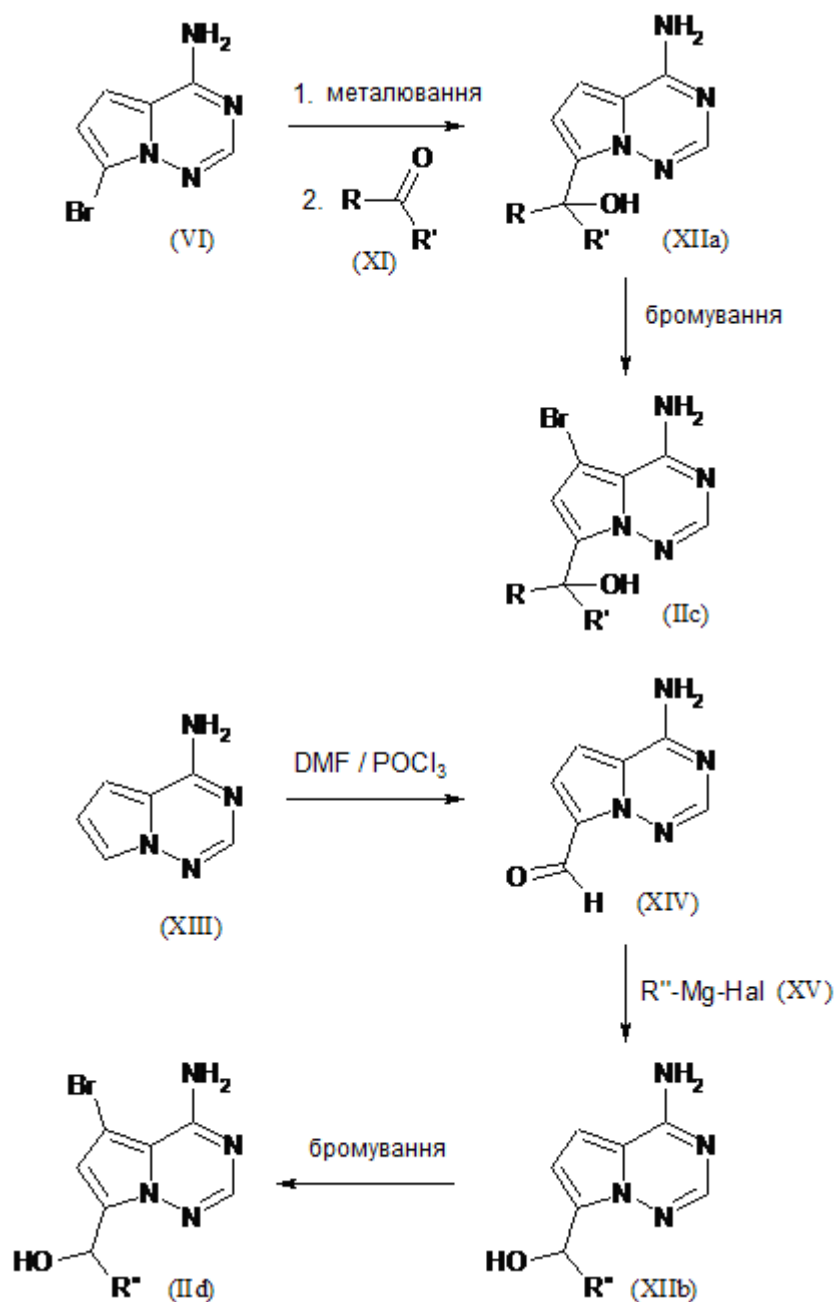
25       Одержання вихідної сполуки 7-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну (VI) було описано раніше [дивитись WO 2007/056170-A2 (проміжна сполука B)].

Схема 2



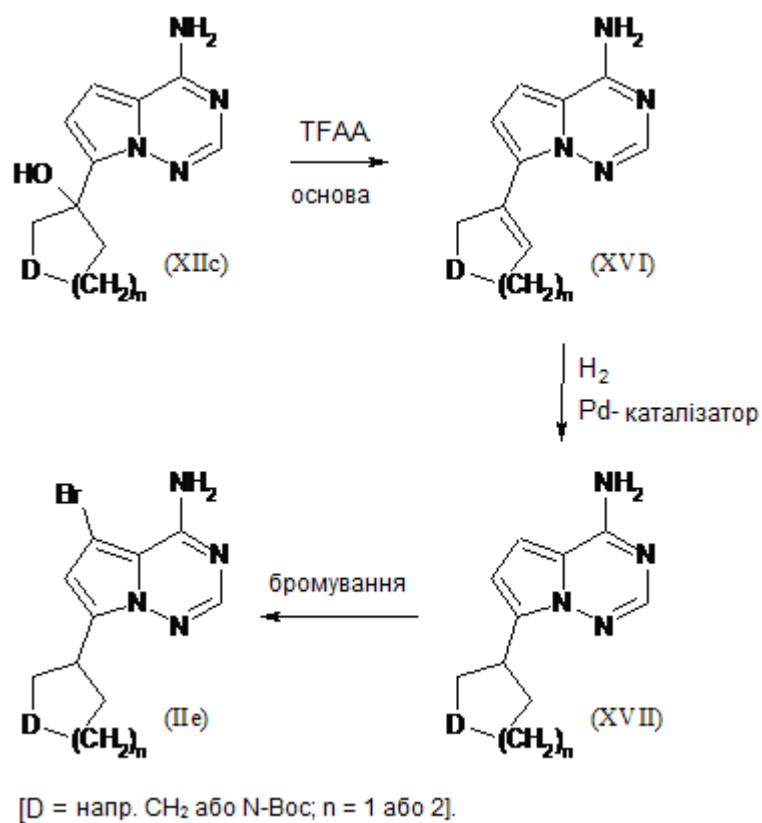
- 5 Попередники бромпіролотриазинів типу (IIc) (схема 3) можуть бути одержані шляхом металювання сполуки (VI) металом, таким як магній або літій, або шляхом заміни галоген-метал, використовуючи орґано-магній або орґано-літій реагент. Бажаним металом є магній, який вводять у сполуку (VI) шляхом обробки ізопропілмагній бромідом у розчиннику, такому як ТГФ або діетиловий етер. Орґано-металеві проміжні сполуки потім піддають реагуванню з
- 10 циклоалканом або гетероциклоалканом (XI) [R,R' зв'язані разом з утворенням циклоалкільного або гетероциклоалкільного кільця] з одержанням третинного спирту (XIIa).
- Додатковий шлях, що приводить до одержання вторинних спиртів формули (XIIb), використовує реакцію формілування Вілсмаєра, внаслідок чого амінопіролотриазин (XIII) перетворюється на альдегід (XIV) (схема 3). Введення бокового ланцюгу здійснюється наступним додаванням відповідного реагенту Гріґнарда (XV) [R" = алкіл або циклоалкіл] у розчиннику, такому як ТГФ або діетиловий етер. Наприкінці, бромовання сполук (XIIa) та (XIIb) здійснюють бажано, використовуючи 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн, у інертному розчиннику, такому як ТГФ або ДМФ, з одержанням бажаних піролотриазинів (IIc) та (IId), відповідно.
- Одержання вихідної сполуки піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну (XIII) було описано раніше
- 20 [дивитись WO 2007/056170-A2 (проміжна сполука A)].

Схема 3



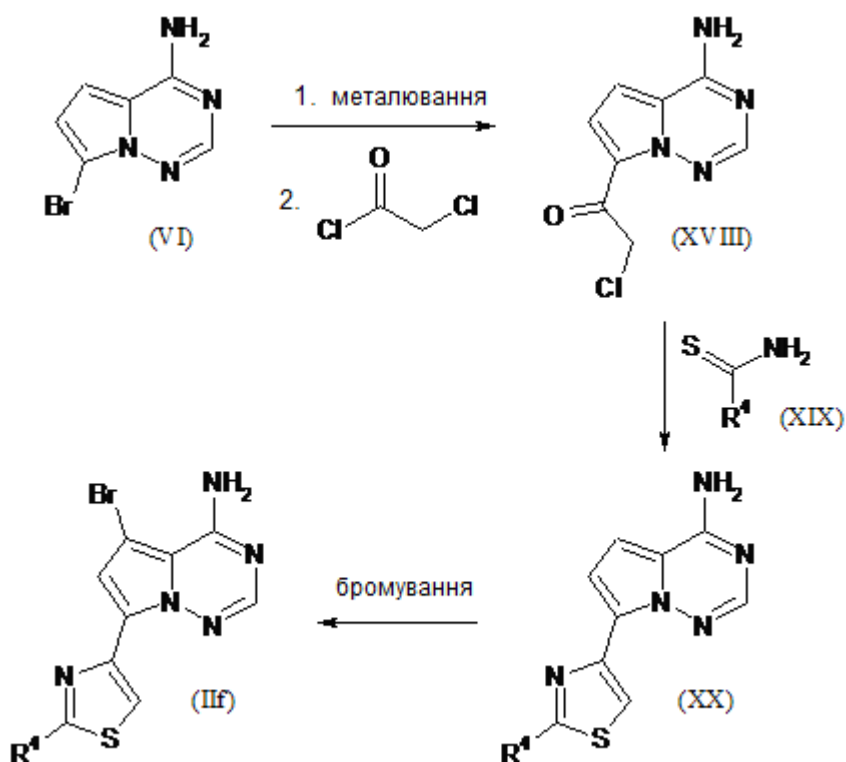
- 5 Піролотриазини формули (II), де Z означає незаміщений циклоалкіл або вуглець-приєднаний аза-гетероциклі, можуть бути одержані дегідруванням третинного спирту формули (XIIc) до ненасиченого карбо- або гетероциклу формули (XVI), застосовуючи звичайні агенти, такі як ангідрид трифтороцтової кислоти, ангідрид трифторметансульфонової кислоти, оксид фосфору(V), сірчана кислота або інші сильні кислоти (схема 4). Наступне каталітичне
- 10 гідрування здійснюють, використовуючи звичайний каталізатор, такий як паладій на вугіллі, з одержанням насиченого аналога формули (XVII). Стадію гідрування бажано здійснюють у розчиннику, такому як метанол, етанол або THF, які містять невелику кількість водної трифтороцтової кислоти. Наприкінці, бромовання з 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїном, як описано вище, забезпечує одержання бажаного піролотриазину (IIe).
- 15 Попередники спирту (XIIc) самі по собі легко одержати шляхом синтезу, зображеного на схемі 3 [посилання, одержання сполуки (XIIa)].

Схема 4



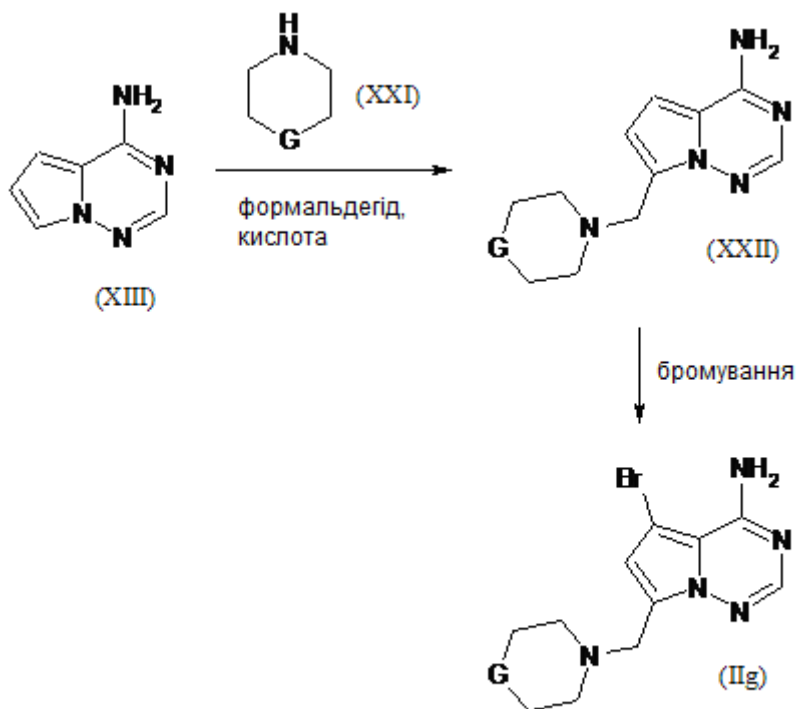
- 5 Піролотриязини формули (II) де Z означає 1,3-тіазол-4-іл, можуть бути одержані металюванням сполуки (VI), як описано вище, після чого реагування з хлорацетил хлоридом з одержанням проміжної сполуки (XVIII), та після чого конденсуванням з тіоамідом або тіосечовиною (XIX) [з  $R^4$  як визначено вище] з одержанням попередника сполуки (XX) (схема 5).
- 10 Бромовання з 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїном, як описано вище, наприкінці забезпечує бажаним піролотриязином (IIf).

Схема 5



Піролотриазини формули (II), де Z означає N-циклічний аміном етил, можуть бути одержані  
 5 реагуванням піролотриазину (XIII) з формальдегідом та циклічним аміном типу (XXI) у  
 кислотному розчиннику, такому як оцтова кислота, або у суміші кислоти з органічним  
 розчинником (схема 6). Бромовання одержаного продукту (XXII) з 1,3-дибром-5,5-  
 диметилгідантоїном, як описано вище, потім забезпечує бажаним піролотриaziном (IIg).

Схема 6



[G = напр.  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{OH})$ , O або N-Boc].

Сполуки формул (V), (VII), (XI), (XV), (XIX) та (XXI) є або наявними на ринку, відомими з літератури, або можуть бути одержані з наявних вихідних матеріалів шляхом адаптації стандартних способів, описаних в літературі.

Сполуки даного винаходу мають цінні фармакологічні властивості та можуть бути використані для профілактики та лікування захворювань у людини та тварин.

Сполуки даного винаходу є сильними та селективними інгібіторами ALK1 кінази. Тому, вони можуть бути використані для лікування та/або профілактики ангіогенез-опосередкованих розладів, зокрема, ангіогенез-опосередкованих розладів очей.

Для даного винаходу, термін "лікування" включає інгібування, затримку, полегшення, пом'якшення, призупинення, зменшення або викликання регресії захворювання, розладу, стану, їх розвитку та/або прогресу, та/або їх симптомів. Термін "профілактика" включає зменшення ризику набуття, зараження або перебігу захворювання, розладу, стану, їх розвитку та/або прогресу, та/або їх симптомів. Термін профілактика включає профілактику. Лікування або профілактика захворювання, розладу, стану може бути частковим або повним.

Ангіогенез-пов'язані очні розлади, що можна лікувати та/або запобігати сполуками даного винаходу включають, проте не обмежуються наступними: вік-опосередкована макулярна дистрофія (AMD), діабетична ретинопатія, зокрема, діабетичний макулярний набряк (DME), інші ретинопатії, такі як хоріоїдальна неоваскуляризація (CNV), хоріоїдальна неоваскулярна мембрана (CNVM), кістозний макулярний набряк (CME), епі-ретинальна мембрана (ERM) та розрив сітківки, гіпертрофічні зміни пігментного епітелію сітківки (RPE), атрофічні зімни пігментного епітелію сітківки, відшарування сітківки, хоріоїдальна закупорка вен, закупорка вен сітківки, корнеальний ангіогенез після, наприклад, кератиту, трансплантації рогики або кератопластики, корнеальний ангіогенез внаслідок гіпоксії (наприклад, викликаний надмірним вживанням контактних лінз), крилоподібна плева кон'юнктиви, субретинальний набряк та інтраретинальний набряк.

В контексті даного винаходу, термін вік-опосередкована макулярна дистрофія (AMD) включає як вологі (або ексудативні, неоваскулярні), так і сухі (або не-ексудативні, не-неоваскулярні) прояви AMD.

Сполуки даного винаходу також можуть бути використані для лікування та/або профілактики запальних захворювань, пов'язаних з ангіогенезом, таких як ревматоїдний артрит, псоріаз, контактний дерматит, астма, легенева гіпертензія, розсіяний склероз, та запальних захворювань травного тракту, таких як хвороба Крона. Фіброзні захворювання, такі як фіброз та цироз, також можуть лікуватись та/або їм можна запобігти сполуками даного винаходу.

На основі їх активного профілю, сполуки даного винаходу є особливо придатними для лікування та/або профілактики очних розладів, такі як вік-опосередкована макулярна дистрофія (AMD), хоріоїдальна неоваскуляризація (CNV), діабетична ретинопатія, та діабетичний макулярний набряк (DME).

Вищезгадані розлади були охарактеризовані у людей, проте також існують із подібною етіологією у інших тварин, включаючи ссавців, та можуть лікуватись цими сполуками даного винаходу.

Таким чином, даний винахід також стосується застосування сполук винаходу для лікування та/або профілактики розладів, особливо вищезгаданих розладів.

Даний винахід також стосується застосування сполук винаходу для одержання фармацевтичної композиції для лікування та/або профілактики розладів, особливо вищезгаданих розладів.

Даний винахід також стосується застосування сполук винаходу у способі лікування та/або профілактики розладів, особливо вищезгаданих розладів.

Даний винахід також стосується способу для лікування та/або профілактики розладів, особливо вищезгаданих розладів, шляхом використання ефективної кількості щонайменше однієї сполуки винаходу.

Сполуки даного винаходу можуть бути введені як окремий фармацевтичний агент або комбінація одного або кількох терапевтичних агентів, де комбінація не викликає шкідливих побічних ефектів. Така комбінаційна терапія включає введення окремої фармацевтичної дозованої форми, яка містить сполуку формули (I), як визначено вище, та один або кілька додаткових терапевтичних агентів, а також введення сполуки формули (I) та кожного додаткового терапевтичного агента у окремій власній фармацевтичній дозованій формі. Наприклад, сполука формули (I) та терапевтичний агент можуть бути введені пацієнту разом у окремій оральній дозованій композиції, такий як таблетка або капсула, або кожен агент може бути введений у окремій дозованій формі.

Коли використовують окремі дозовані форми, сполука формули (I) та один або кілька



додаткових терапевтичних агентів можуть бути введені по суті одночасно (тобто, одночасно) або окремо поступово (тобто, послідовно).

Зокрема, сполуки даного винаходу можуть бути використані у фіксованій або окремій комбінації з інгібіторами VEGF-опосередкованого ангіогенезу, такими як, наприклад, АСТВ-1003, 5 афліберцепт, апатиніб, акситиніб, бевацизумаб, бевасираніб, ВМС-690514, бриваніб, цедираніб, СТ-322, довітиніб, Е7080, форетиніб, КН-902, лініфаніб, МGCD-265, мотезаніб, ОТС-102, пазопаніб, пегаптаніб, ранібізумаб, регорафеніб, рубоксистаурин, сорафеніб, SU-14813, сунітиніб, телатиніб, ТG-100801, тивозаніб, TSU-68, вандетаніб, варгатеф, ваталаніб та XL-184, або з інгібіторами інших сигнальних шляхів, такими як, наприклад, АСU-4429, дисульфірам, Е-10030, 10 фенретинід, мекаміламін, РF-04523655, сиролімус, сонепцизумаб, тандоспірон та волюциксимаб.

Таким чином, у подальшому варіанті втілення, даний винахід стосується фармацевтичних композицій, що містять щонайменше одну з сполук винаходу та один або кілька додаткових 15 терапевтичних агентів для лікування та/або профілактики розладів, особливо вищезгаданих розладів.

Сполуки даного винаходу також можуть використовуватись як такі або в композиціях, в дослідженнях або діагностиці, або як аналітичні порівнювальні стандарти тощо.

У іншому аспекті, даний винахід стосується фармацевтичних композицій, що містять щонайменше одну з сполук винаходу разом з одним або кількома інертними, нетоксичними, 20 фармацевтично прийнятними ексціпієнтами, та їх застосування з вищенаведеною метою.

Сполуки винаходу можуть діяти системно та/або локально. З цією метою, їх можна вводити придатним чином, таким як, наприклад, орально, парентерально, легенево, назально, лінгвально, сублінгвально, букально, ректально, дермально, трансдермально, в кон'юнктиву, під 25 кон'юнктиву, інтравітреально, у вухо або місцево.

Сполуки винаходу можуть бути введені у формах нанесення, придатних для цих шляхів введення.

Придатними для орального введення є форми нанесення, які функціонують згідно попереднього рівня техніки та доставляють сполуки винаходу швидко та/або модифіковано, та що містять сполуки винаходу у кристалічній, аморфній та/або розчиненій формі, такий як, 30 наприклад, таблетки (таблетки з покриттям або без, наприклад, з кишковим покриттям або покриттями, що є нерозчинними або розчиняються із затримкою та контролюють вивільнення сполуки винаходу), таблетки, що швидко розкладаються у ротовій порожнині, або плівки/пластини, плівки/ліофілізати, капсули (наприклад, тверді або м'які желатинові капсули), таблетки з цукровим покриттям, гранули, пелети, порошки, емульсії, суспензії, аерозолі або 35 розчини.

Парентеральне введення може здійснюватись без стадії абсорбції (наприклад, внутрішньовенно, інтратеріально, інтракардіально, інтраспінально або інтралюмбарно) або з включенням абсорбції (наприклад, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньошкірно, чрезшкірно або інтраперітонеально). Форми застосування, придатні для парентерального введення, 40 включають, серед інших, форми для ін'єкцій та інфузій у формі розчинів, суспензій, емульсій, ліофілізатів або стерильних порошків.

Форми, придатні для інших шляхів введення, включають, наприклад, фармацевтичні форми для інгаляції (наприклад, порошкові інгалятори, розпилювачі), назальні краплі, розчини або спреї, таблетки або капсули для лінгвального, сублінгвального або букального введення 45 (наприклад, пастилки, лозенждери), супозиторії, очні або вушні препаративні форми (наприклад, краплі, мазі), вагінальні капсули, водні суспензії (лосьйони, змішувані суміші), ліпофільні суспензії, мазі, креми, молочко, пасти, піни, пилоподібні порошки, та трансдермальні терапевтичні системи (наприклад, пластирі).

Сполуки винаходу можуть бути перетворені на перелічені форми застосування відомими 50 чином, шляхом змішування з інертними, нетоксичними, фармацевтично прийнятними ексціпієнтами. Ці ексціпієнти включають, серед інших, носії (наприклад, мікрокристалічна целюлоза, лактоза, манітол), розчинники (наприклад, рідкі поліетиленгліколи), емульгатори (наприклад, додецилсульфат натрію), поверхнево-активні речовини (наприклад, поліоксисорбітан олеат), дисперсанти (наприклад, полівінілпіролідон), штучні та природні полімери (наприклад, альбумін), стабілізатори (наприклад, антиоксиданти, такі як, наприклад, аскорбінова кислота), барвники (наприклад, неорганічні пігменти, такі як, наприклад, оксиди заліза), та смакові добавки та/або агенти маскування запаху.

Зазвичай бажано вводити при парентеральному введенні кількість від приблизно 0,001 до 1 мг/кг, бажано приблизно 0,01-0,5 мг/кг маси тіла для досягнення ефективних результатів. При 60 оральному введенні, приклад діапазону доз становить приблизно 0,01-100 мг/кг, бажано

приблизно 0,01-20 мг/кг, та більш бажано приблизно 0,1-10 мг/кг маси тіла.

Тим не менш, актуальні рівні доз та період дії введених активних інгредієнтів в фармацевтичних композиціях винаходу можуть різнитись так, щоб отримати кількість активного інгредієнта, що є ефективною для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для певного пацієнта, композиція та шлях введення, що є нетоксичними для пацієнта. Тому може бути необхідним відхилитись від вказаних кількостей, зокрема, з поправкою на вік, стать, масу тіла, раціон харчування та загальний стан здоров'я пацієнта, шлях введення, індивідуальну відповідь на активний інгредієнт, природу препаративної форми, та час або інтервал протягом якого триває введення. Таким чином, в деяких випадках може бути бажаним використати менше, ніж вищенаведену мінімальну кількість, у той час як в інших випадках вказаний вищий ліміт може бути перевищеним. У випадку введення більшої кількості може бути бажаним поділити її на багато окремих доз розподілених продовж доби.

Для лікування та/або профілактики очних розладів, як описано вище, бажаним шляхом введення сполук винаходу є місцево у око або за допомогою очної системи доставки лікарського засобу. Внутрішньо очні ін'єкції є іншим шляхом введення сполуки даного винаходу, придатним для таких цілей.

Доставка до ділянок всередині ока здійснюється шляхом ін'єкції, застосовуючи канюлю або інший інвазивний пристрій, розроблений для введення чітко визначеної кількості бажаної композиції у певну ділянку або тканину всередині ока (наприклад, задня камера або сітківка). Внутрішньо очна ін'єкція може вводиться у склоподібне тіло (інтравітреально), під кон'юнктиву (під кон'юнктиву), позаду ока (ретробульбарно), у склеру, або під тенонову капсулу (суб-тенон), та може знаходитись у формі депо. Інші внутрішньо очні шляхи введення та місця ін'єкцій та форми мають на увазі та включені у рамки винаходу.

Сполуки винаходу можуть бути сформульовані відомим фахівцю у галузі чином, так щоб забезпечити потрібну доставку у задню частину ока, за допомогою звичайного дозування, такого як очні краплі, або використовуючи систему доставки щоб забезпечити контрольоване вивільнення, таке як уповільнене вивільнення сполук винаходу.

Бажані очні композиції сполук даного винаходу включають водні розчини, суспензії або гелі цих сполук у формі крапель рідини, рідких промивань, спреїв, мазей або гелей, у домішках з екціпієнтами, придатними для виробництва та застосування таких форм введення. Альтернативно, сполуки даного винаходу можуть бути введені у око за допомогою ліпосом або інших очних систем доставки, відомих у галузі.

Відповідні рівні доз можна визначити будь-яким придатним способом, відомим фахівцю у галузі лікування очних хвороб. Бажано, активну сполуку вводять з частотою 1-4 рази на добу для місцевого введення, або не так часто, якщо використовують систему доставки лікарського засобу. Зазвичай, очна композиція для місцевого застосування містить активний інгредієнт в діапазоні концентрацій приблизно 0,001 % - 10 %.

Наступні приклади варіантів втілення ілюструють винахід. Винахід не є обмеженим прикладами.

Проценти в наступних тестах та прикладах є, доки не вказано протилежне, масовими; частини є масовими. Співвідношення розчинів, розведень та концентрацій, вказаних для розчинів рідина/рідина, всі є об'ємними.

А. Приклади

Скорочення та акроніми:

Ac	ацетил
вод.	водний (розчин)
Boc	трет-бутоксикарбоніл
ш.	широкий ( <sup>1</sup> H ЯМР сигнал)
Cbz	бензилоксикарбоніл
Celite®	Зареєстрована торгівельна марка корпорації Celite, бренд діатомової землі
конц.	концентрований
ПХІ	пряма хімічна іонізація (МС)
ДХМ	дихлорметан
ДМФ	N,N-диметилформамід
ДМСО	диметилсульфоксид
е.н.	енантіомерний надлишок
EI	іонізація електронним ударом (МС)
ent	енантіомер, енантіомерно чистий
екв.	еквівалент(и)
ESI	електро-спрей іонізація (МС)
Et	етил
EtOAc	етилацетат
Fmoc	(9H-флуорен-9-ілметокси)карбоніл
ГХ/МС	газова хроматографія-спарена з мас-спектрометрією
год.	годин(и)
Гал	галоген
<sup>1</sup> H ЯМР	спектроскопія ядерно-магнітного резонансу
ВЕРХ	високоєфективна рідинна хроматографія
РХ/МС	рідинна хроматографія-спарена з мас-спектрометрією
Me	метил
MeOH	метанол
Хв.	хвилин(и)
МС	мас-спектроскопія
теор.	теоретичне (хімічний вихід)
PdCl <sub>2</sub> (dppf)	[1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II)
Ph	феніл
Рац.	рацемічна, рацемат
R <sub>f</sub>	ТШХ фактор утримання
к.т.	кімнатна температура
R <sub>t</sub>	час утримання (ВЕРХ)
насич.	насичений
ТБАФ	тетрабутиламонію фторид
tBu	трет-бутил
трет	третинний
ТФК	трифтороцтова кислота
ТФКА	ангідрид трифтороцтової кислоти
ТГФ	тетрагідрофуран
ТШХ	тонко-шарова хроматографія

Способи очистки препаративної ВЕРХ:

Спосіб 1:

- 5 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: ReproSil C18, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода / 1 % аміак, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 5,01-31 хв. 95 % В, 31 хв. 95 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 2:

- 10 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Kromasil-100A C18, 5 мкм, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода / 0,05-0,5 % ТФК, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-5 хв. 5 % В, 5,01-10 хв. 10 % В, 10,01-20 хв. 40 % В, 20,01-27 хв. 50 % В, 27,01-40 хв. 60 % В, 40,01-45 хв. 90 % В, 45,01-60 хв. 100 % В; швидкість потоку: 15-60 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 3:

Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Grom-Sil-120 ODS-4HE,

250 мм × 30 мм; елюент А: вода, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 3,01-35 хв. 98 % В, 35,01-40 хв. 98 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 4:

- 5 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Grom-Sil-120 ODS-4HE, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода / 0,5 % аміак, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 3,01-35 хв. 98 % В, 35,01-40 хв. 98 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 5:

- 10 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Chromatorex C18 10 мкм, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 5,01-31 хв. 90 % В, 31 хв. 90 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 6:

- 15 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Chromatorex C18 10 мкм, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода / 0,5 % ТФК, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 5,01-31 хв. 90 % В, 31 хв. 90 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 7:

- 15 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: ReproSil C18 10 мкм, 250 мм × 40 мм; елюент А: вода, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 5,01-31 хв. 95 % В, 31 хв. 95 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 8:

- 20 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: ReproSil C18 10 мкм, 250 мм × 30 мм; елюент А: вода, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0-3 хв. 10 % В, 5,01-31 хв. 95 % В, 31 хв. 95 % В; швидкість потоку: 50 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 9:

- 25 Пристрій: Gilson Abimed ВЕРХ, бінарна насосна система; колонка: Waters Sunfire C18 5 мкм, 250 мм × 20 мм; елюент А: вода, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0 хв. 20 % В, 15 хв. 60 % В, 15,01-19 хв. 20 % В; швидкість потоку: 25 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Способи аналітичної ВЕРХ, РХ/МС та ГХ/МС:

Спосіб 1 (ВЕРХ):

- 30 Інструмент: Agilent 1100 з виявленням DAD; колонка: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6, 150 мм × 5 мм; елюент А: 0,01 % ТФК у воді, елюент В: 0,01 % ТФК у ацетонітрилі; градієнт: 0-1 хв. 10 % В, 4-5 хв. 90 % В, 5,5 хв. 10 % В; швидкість потоку: 2,0 мл/хв.; температура: 30 °С; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 2 (ВЕРХ):

- 35 Інструмент: HP 1100 з виявленням DAD; колонка: Kromasil 100 RP-18, 60 мм × 2,1 мм, 3,5 мкм; елюент А: 5 мл (пер)хлорної кислоти (70 %) / л води, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0 хв. 2 % В, 0,5 хв. 2 % В, 4,5 хв. 90 % В, 6,5 хв. 90 % В, 6,7 хв. 2 % В, 7,5 хв. 2 % В; швидкість потоку: 0,75 мл/хв.; температура: 30 °С; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 3 (ВЕРХ):

- 40 Інструмент: HP 1100 з виявленням DAD; колонка: Kromasil 100 RP-18, 60 мм × 2,1 мм, 3,5 мкм; елюент А: 5 мл (пер)хлорної кислоти (70 %) / л води, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0 хв. 2 % В, 0,5 хв. 2 % В, 4,5 хв. 90 % В, 9 хв. 90 % В, 9,2 хв. 2 % В, 10 хв. 2 % В; швидкість потоку: 0,75 мл/хв.; температура: 30 °С; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 4 (РХ/МС):

- 45 Інструмент: Micromass Platform LCZ з ВЕРХ Agilent 1100 Series; колонка: Thermo Hypersil GOLD 3μ, 20 мм × 4 мм; елюент А: 1 л води + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти, елюент В: 1 л ацетонітрилу + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти; градієнт: 0,0 хв. 100 % А → 0,2 хв. 100 % А → 2,9 хв. 30 % А → 3,1 хв. 10 % А → 5,5 хв. 10 % А; температура: 50 °С; швидкість потоку: 0,8 мл/хв.; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 5 (РХ/МС):

- 50 Інструмент: Micromass ZQ з ВЕРХ Waters Alliance 2795 / HP 1100; колонка: Phenomenex Synergi 2,5μ MAX-RP 100A Mercury, 20 мм × 4 мм; елюент А: 1 л води + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти, елюент В: 1 л ацетонітрилу + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти; градієнт: 0,0 хв. 90 % А → 2,5 хв. 30 % А → 3,0 хв. 5 % А → 4,0 хв. 5 % А; швидкість потоку: 2 мл/хв.; температура: 50 °С; УФ виявлення: 210 нм.

- 55 Спосіб 6 (РХ/МС):

Інструмент: Micromass Quattro Premier з Waters UPLC Acquity; колонка: Thermo Hypersil GOLD 1,9μ, 50 мм × 1 мм; елюент А: 1 л води + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти, елюент В: 1 л ацетонітрилу + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти; градієнт: 0,0 хв. 90 % А → 0,1 хв. 90 % А → 1,5 хв. 10 % А → 2,2 хв. 10 % А; температура: 50 °С; швидкість потоку: 0,33 мл/хв.; УФ виявлення:

210 нм.

Спосіб 7 (PX/MC):

Інструмент: Micromass ZQ з BEPX Waters Alliance 2795; колонка: Phenomenex Synergi 2,5μ MAX-RP 100A Mercury, 20 мм × 4 мм; елюент А: 1 л води + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти, елюент В: 1 л ацетонітрил + 0,5 мл 50 % мурашиної кислоти; градієнт: 0,0 хв. 90 % А → 0,1 хв. 90 % А → 3,0 хв. 5 % А → 4,0 хв. 5 % А → 4,01 хв. 90 % А; швидкість потоку: 2 мл/хв.; температура: 50 °С; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 8 (ГХ/MC):

Інструмент: Micromass GCT, GC6890; колонка: Restek RTX-35, 15 м × 200 мкм × 0,33 мкм; постійний потік з гелієм: 0,88 мл/хв.; пічка: 70 °С; впорск: 250 °С; градієнт: 70 °С, 30 °С/хв. → 310 °С (тримають протягом 3 хв.).

Спосіб 9 (BEPX):

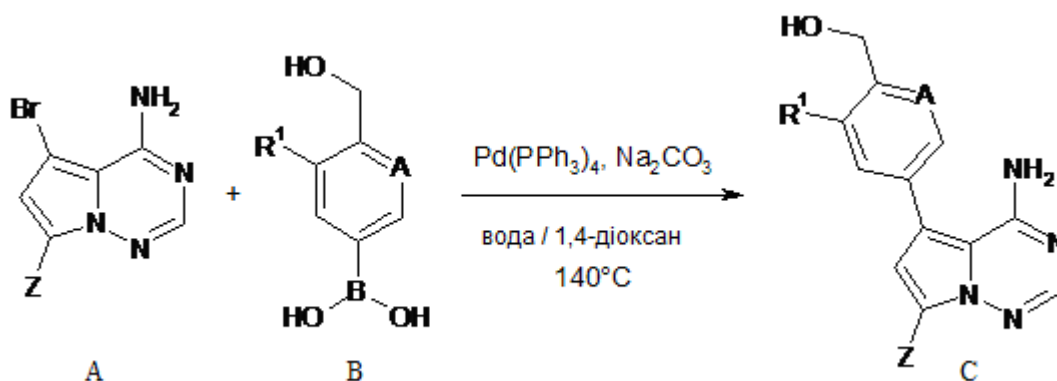
Інструмент: Agilent 1100 з виявленням DAD; колонка: Merck Chromolith Speed ROD, 150 мм × 5 мм; елюент А: 0,01 % мурашина кислота у воді, елюент В: ацетонітрил; градієнт: 0 хв. 5 % В, 2,5 хв. 95 % В, 3 хв. 95 % В; швидкість потоку: 5,0 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 210 нм.

Спосіб 10 (PX/MC):

Інструмент: Waters Acquity SQD UPLC System; колонка: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8μ, 50 мм × 1 мм; елюент А: 1 л води + 0,25 мл 99 % мурашиної кислоти, елюент В: 1 л ацетонітрилу + 0,25 мл 99 % мурашиної кислоти; градієнт: 0,0 хв. 90 % А → 1,2 хв. 5 % А → 2,0 хв. 5 % А; температура: 50 °С; швидкість потоку: 0,40 мл/хв.; УФ виявлення: 208-400 нм.

Загальний спосіб синтезу 1:

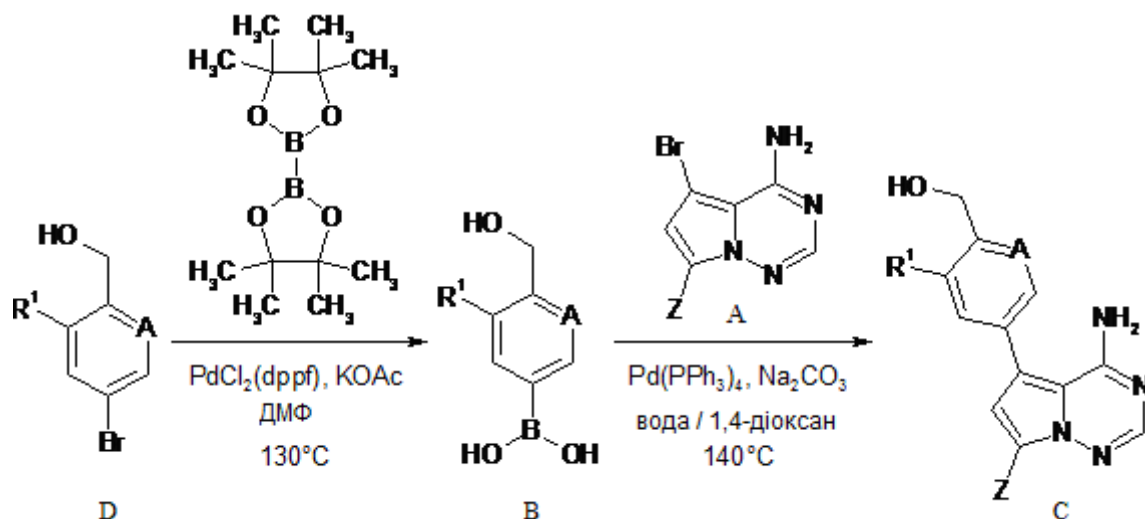
Конденсація Сузукі похідних 5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазину з арилбороновими кислотами або естерами:



5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин А (приблизно 0,5 ммоль), арилборонову кислоту В (1,2 еквіваленти) або відповідний бороновий естер, наприклад, диметил боронат або пінаcolato боронат, та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (0,1 еквіваленти) розчиняли у суміші 1,4-діоксану (приблизно 4,0 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,5 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, реакційну суміш фільтрували крізь шар селіту, який промивали 1,4-діоксаном для вимивання всіх органічних речовин. Об'єднаний фільтрат випаровували до сухого залишку при пониженому тиску, та залишок очищали препаративною ВЕРХ з одержанням потрібної сполуки С.

Загальний спосіб синтезу 2:

Борилювання арилбромідів та наступна конденсація Сузукі з похідними 5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазину без виділення проміжної арилборонової кислоти або естеру:

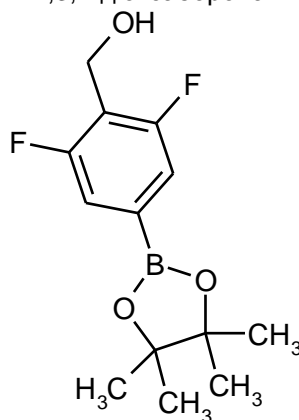


Арилбромід D (приблизно 0,5 ммоль) розчиняли у ДМФ (3 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки, аргон барботували крізь розчин протягом 5 хв., та додавали комплекс [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II)-дихлорметан (0,1 еквіваленти), ацетат калію (3 еквіваленти) та біс(пінаcolato)дибор (1,2 еквіваленти). Колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 130 °С протягом 60 хв. у одномодовій мікрохвильовій пічці. Потім, суспензію фільтрували, фільтрат переносили у іншу колбу для мікрохвильової пічки, та додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (0,1 еквіваленти), 2 М водний розчин карбонату натрію (4 еквіваленти) та 5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин A (1 еквівалент). Колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Неочищену реакційну суміш одержану таким чином безпосередньо ін'єктували у колонку для препаративної ВЕРХ для розділення та очистки потрібної сполуки C.

Вихідні матеріали та проміжні сполуки:

Проміжна сполука 1A

[2,6-Дифтор-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл]метанол

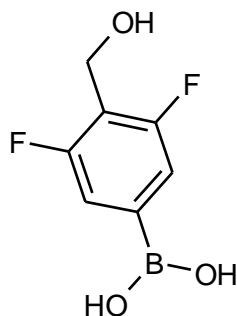


(4-Бром-2,6-дифторфеніл)метанол (1,03 г, 4,62 ммоль) розчиняли у сухому 1,4-діоксані (10 мл). Аргон барботували крізь розчин, потім додавали комплекс [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію-дихлорметан (302 мг, 0,37 ммоль, 0,08 екв.), безводний ацетат калію (907 мг, 9,24 ммоль, 2 екв.) та біс(пінаcolato)дибор (1,23 г, 4,85 ммоль, 1,05 екв.), та суміш нагрівали до 130 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Під час охолодження, суміш фільтрували, та розчинник видаляли при пониженому тиску. Циклогексан (200 мл) додавали до залишку, та суміш ретельно перемішували протягом 30 хв. Нерозчинений матеріал потім видаляли фільтруванням, циклогексан відганяли, та залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі (дихлорметан/ацетонітрил градієнт). Фракції, що містили продукт, об'єднували та випаровували. Зазначену у заголовку сполуку кристалізували спонтанно у вигляді коричневої твердої речовини. Вихід: 790 мг (63 % теор.).

GC-МС (спосіб 8):  $R_t$ =5,36 хв.; МС (EI):  $m/z$  (%) = 270,3 (15)  $[M]^+$ .

Проміжна сполука 2A

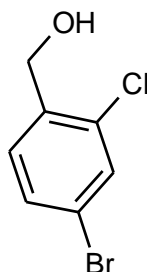
[3,5-Дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]боронова кислота



[4-({[трет-Бутил(диметил)силіл]окси}метил)-3,5-дифторфеніл]боронова кислота (19,3 г, 63,9 ммоль; неочищений матеріал, одержаний за способом Hattori, Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3258-3262) розчиняли у 400 мл водної оцтової кислоти (66 %) та перемішували при 40 °С протягом 5 год. Розчин потім випаровували при пониженому тиску, та залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі (градієнт елюювання 0-2 % метанол у дихлорметані) з одержанням 3,46 г (25 % теор., РХ-МС чистота 87 %) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=0,50$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 171,2 (100)  $[M-OH]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 187,3 (100)  $[M-H]^-$ .

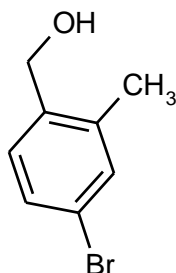
Проміжна сполука 3А  
(4-Бром-2-хлорфеніл)метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за процедурою, описаною у WO 2004/074270-A2 [Приклад А(147), стадія 1].

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,00 (ш, 1H), 4,74 (с, 2H), 7,38 (д, 1H), 7,43 (дд, 1H), 7,53 (д, 1H).

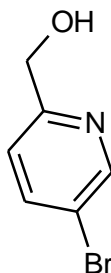
Проміжна сполука 4А  
(4-Бром-2-метилфеніл)метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за процедурою, описаною у EP 1 544 208-A1 (Порівняльний Приклад 14).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,62 (т, 3H), 2,32 (с, 3H), 4,64 (д, 2H), 7,23 (д, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,33 (д, 1H).

Проміжна сполука 5А  
(5-Бромпіридин-2-іл)метанол



Метил 5-бромпіридин-2-карбоксилат (2,00 г, 9,27 ммоль) розчиняли у етанолі (20,0 мл). Боргідрид натрію (1,05 г, 27,8 ммоль) додавали при 0 °С, та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 год. Потім суміш концентрували при пониженому тиску, гасили 1 N хлорводневою кислотою, нейтралізували твердим карбонатом калію та екстрагували

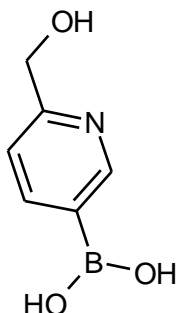
5

дихлорметаном. Органічний шар висушували над сульфатом магнію та випаровували з одержанням 1,57 г (90 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

PX-МС (спосіб 6):  $R_f=0,56$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 188,0 (100)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 6A

[6-(Гідроксиметил)піридин-3-іл]боронова кислота



10

До розчину проміжної сполуки 5A (1,50 г, 7,98 ммоль) та біс(пінаcolato)дибору (2,23 г, 8,28 ммоль) у дегазованому ДМФ (120 мл) додавали в атмосфері аргону 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-паладію(II) хлорид (292 мг, 0,40 ммоль) та ацетат калію (2,35 г, 23,9 ммоль). Суміш нагрівали до 80 °С протягом 18 год. та потім охолоджували до кімнатної температури. Суспензію фільтрували, та залишок промивали діоксаном. Об'єднані фільтрати концентрували при пониженому тиску, та олійний залишок відбирали у 50 мл етилацетату та 50 мл циклогексану, та залишали відстоюватись при кімнатній температурі протягом ночі. Одержаний осад збирали фільтруванням та викидали. Фільтрат випаровували, та залишок знову розчиняли у 100 мл етилацетату та двічі екстрагували з 50 мл води. Водний шар концентрували з одержанням 690 мг (56 % теор.) вказаної у заголовку сполуки, яку використовували без подальшої очистки.

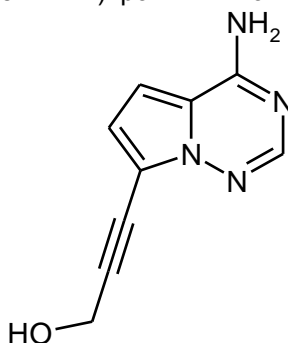
15

20

PX-МС (спосіб 6):  $R_f=0,18$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 154,0 (100)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 7A

3-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)проп-2-ін-1-ол



25

Вихідний матеріал 7-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука B).

7-Бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (1,0 г, 4,69 ммоль), йодид міді(I) (89 мг, 0,47 ммоль, 0,1 екв.) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (542 мг, 0,47 ммоль, 0,1 екв.) завантажували у реакційну колбу для мікрохвильової пічки та вакуумували протягом години. Колбу потім вентильовали аргonom, додавали піролідін (15 мл) та 2-пропін-1-ол (2,63 г, 47 ммоль, 10 екв.), та колбу закривали ізолюючою кришкою та нагрівали до 85 °С протягом 120 хв. у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, реакційну суміш виливали у 120 мл концентрованого водного розчину хлориду амонію, який двічі екстрагували з етилацетатом. Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію та випаровували, та залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage silica колонка, етил ацетат). Одержаний продукт (222 мг) вичавлений чистим за допомогою PX-МС (спосіб 6) та використовували для подальших трансформацій.

30

35

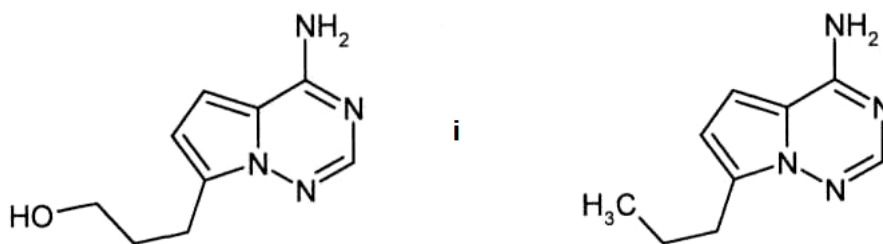
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_f=2,59$  хв.;

40

PX-МС (спосіб 6):  $R_f=0,28$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 189,2 (100)  $[M+H]^+$ .



Проміжна сполука 8A та Проміжна сполука 9A  
3-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)пропан-1-ол та 7-Пропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



5

Проміжну сполуку 7A (444 мг, 2,36 ммоль) розчиняли у оцтовій кислоті (18 мл) в атмосфері аргону. Додавали оксид платини (IV) (40 мг, 0,18 ммоль, 0,08 екв.), та суміш ретельно перемішували протягом 3 год. при кімнатній температурі в атмосфері водню при тиску зовнішнього середовища. Каталізатор потім видаляли фільтруванням, розчинник відганяли, та залишок піддавали флеш-хроматографії (Biotage silica колонка, циклогексан/етилацетат градієнт). Проміжні сполуки 8A (185 мг, 41 % теор.) та 9A (170 мг, 41 % теор.) одержували у двох чітких хроматографічних фракціях:

Проміжна сполука 8A:

ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,68$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,83$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 193,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 191,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,80 (м, 2H), 2,86 (т,  $J=7,7$  Гц, 2H), 3,45 (м, 2H), 4,49 (т,  $J=5,1$  Гц, 1H), 6,41 (д,  $J=4,2$  Гц, 1H), 6,69 (д,  $J=4,2$  Гц, 1H), 7,50 (ш. с, 2H), 7,78 (с, 1H).

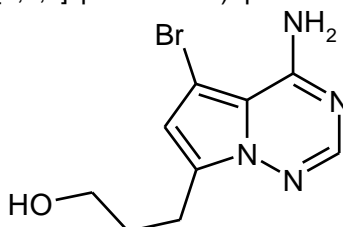
Проміжна сполука 9A:

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,22$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=1,23$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 177,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 175,2 (30)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 10A

3-(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)пропан-1-ол



Проміжну сполуку 8A (105 мг, 0,55 ммоль) розчиняли у ТГФ (8,75 мл) та охолоджували до -20 °С. Додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (78,1 мг, 0,5 екв.), та суміш перемішували при -20 °С протягом години. Потім реакцію гасили 0,5 мл концентрованого водного розчину дитіоніту натрію, нагрівали до кімнатної температури та розділяли між етил ацетатом та водою. Органічну фазу висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли. Вихід: 145 мг (98 % теор.).

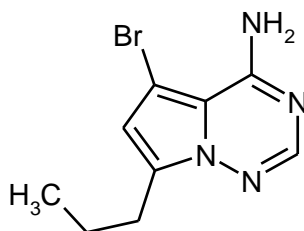
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=2,96$  хв.; ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,95$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,03$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 271,0 (100) та 273,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 269,0 (99) та 271,0 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,75 (м, 2H), 2,83 (т,  $J=8,1$  Гц, 2H), 3,43 (м, 2H), 4,50 (т,  $J=5,4$  Гц, 1H), 6,62 (с, 1H), 7,81 (с, 1H).

Проміжна сполука 11A

5-Бром-7-пропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



Проміжну сполуку 9A (110 мг, 0,62 ммоль) розчиняли у ТГФ (4,44 мл) та охолоджували до -20 °С. Додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (89 мг, 0,5 екв.), та суміш перемішували при -20 °С протягом години. Потім реакцію гасили 0,5 мл концентрованого водного розчину дитіоніту натрію, нагрівали до кімнатної температури та розділяли між етилацетатом та водою. Органічну фазу висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли. Вихід: 154 мг (85 % чистий, 82 % теор.).

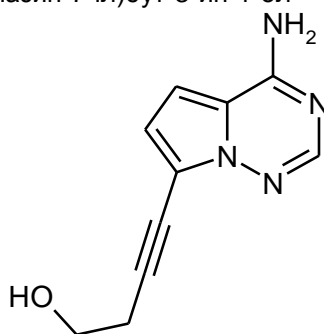
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,78$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,55$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 255,0 (99) та 257,2 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,91 (т,  $J=7,3$  Гц, 3H), 1,65 (м, 2H), 2,79 (т,  $J=7,6$  Гц, 2H), 3,31 (с, 2H), 6,63 (с, 1H), 7,95 (с, 1H).

Проміжна сполука 12A

4-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)бут-3-ин-1-ол



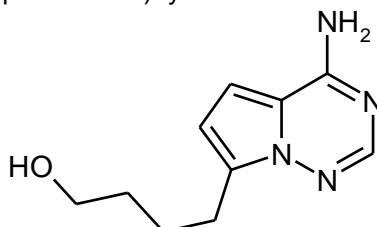
7-Бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (1,0 г, 4,69 ммоль), йодид міді(I) (89 мг, 0,47 ммоль, 0,1 екв.) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (542 мг, 0,47 ммоль, 0,1 екв.) завантажували у реакційну колбу для мікрохвильової пічки та вакуумували протягом години. Колбу потім вентильовали аргонном, додавали піролідін (15 мл) та 3-бутин-1-ол (3,36 г, 47 ммоль, 10 екв.), та колбу закривали ізолюючою кришкою та нагрівали до 85 °С протягом 120 хв. у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, реакційну суміш виливали у 120 мл концентрованого водного розчину хлориду амонію та двічі екстрагували з етилацетатом. Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію та випаровували, та залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage silica колонка, етилацетат). Одержаний продукт (735 мг) був достатньо чистим (66 % за допомогою ВЕРХ) для подальших перетворень.

ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,77$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,96$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 203,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 201,1 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 13A

4-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)бутан-1-ол



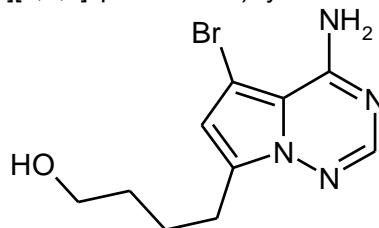
Проміжну сполуку 12A (607 мг, 3,00 ммоль) розчиняли у оцтовій кислоті (64 мл), та додавали оксид платини (IV) (50 мг, 0,22 ммоль, 0,07 екв.). Суміш перемішували в атмосфері водню при тиску зовнішнього середовища протягом 15 год. Каталізатор потім видаляли фільтруванням, фільтрат випаровували при пониженому тиску, та залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage silica колонка, етил ацетат). Вихід: 350 мг (57 % теор.).

ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,92$  хв.;

PX-МС (спосіб 4):  $R_t=0,94$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 207,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ЕСIneg):  $m/z$  (%) = 205,3 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 14А

4-(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)бутан-1-ол



5

Проміжну сполуку 13А (330 мг, 1,60 ммоль) розчиняли у ТГФ (26 мл) при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , та додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (229 мг, 0,80 ммоль). Суміш перемішували при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом години. Потім реакцію гасили концентрованим водним розчином сульфату натрію (0,5 мл). Етилацетат додавали, відділяли водний шар, та органічний шар висушували над сульфатом натрію та випаровували. Неочищений продукт потім очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 175 мг (84 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

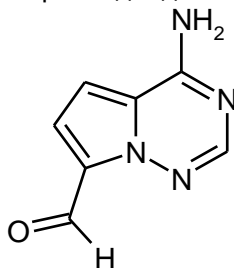
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,13$  хв.;

PX-МС (спосіб 5):  $R_t=1,23$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 285,0 (98) та 287,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ЕСIneg):  $m/z$  (%) = 283,0 (100) та 285,0 (98)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,39-1,48 (м, 2Н), 1,60-1,69 (м, 2Н), 3,31 (т,  $J=7,3$  Гц, 2Н), 3,40 (м, 2Н), 4,46 (ш. с, 1Н), 6,61 (с, 1Н), 7,82 (с, 1Н).

Проміжна сполука 15А

4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-карбальдегід



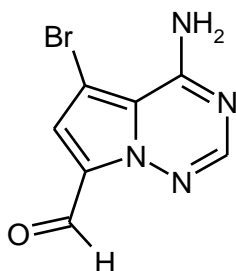
20

Вихідний матеріал піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука А).

Піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (20,5 г, 152 ммоль) розчиняли у 150 мл ДМФ. Охолоджуючи на льоду, фосфорилхлорид (31,3 мл, 336 ммоль) краплями додавали з такою швидкістю, що внутрішня температура не перевищувала  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Потім суміш нагрівали протягом 2 діб при  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Після охолодження, додавали іншу частину фосфорилхлориду (14,2 мл, 152 ммоль), та перемішування продовжували протягом ще 24 год. при  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Після охолодження, реакційну суміш повільно виливали у суміш 2,0 л насиченого водного розчину бікарбонату натрію та 2,0 л етилацетату. Твердий бікарбонат натрію додавали до припинення виділення газу. Шари розділяли, водний шар екстрагували 0,5 л етилацетату, та об'єднані органічні фази висушували над сульфатом натрію та концентрували. Залишок суспендували у 100 мл діізопропілового етеру, перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хв. та потім фільтрували. Висушений залишок перемішували у 6 N хлорводневій кислоті (500 мл) протягом години при  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  та потім виливали у суміш лід/вода (1000 мл). Суміш обережно нейтралізували твердим бікарбонатом натрію, перемішували протягом 30 хв. при кімнатній температурі та потім знову фільтрували. Залишок промивали водою та лігроїном з одержанням 20,6 г (83 % теор.) білих кристалів, які використовували на наступній стадії без подальшої очистки.

Проміжна сполука 16А

4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-карбальдегід

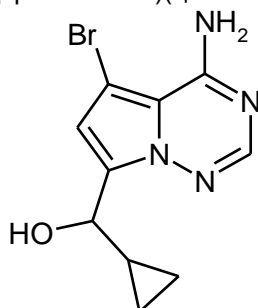


Проміжну сполуку 15A (20,6 г, 127 ммоль) розчиняли у 525 мл ДМФ. При 0 °С додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (21,8 г, 76,2 ммоль), та суміш перемішували протягом години охолоджуючи на льоду та протягом ще 2 год. при кімнатній температурі. Одержану суспензію фільтрували, та залишок промивали ДМФ та діетиловим етером. Фільтрат викидали, та залишені важкорозчинні кристали висушували з одержанням 20,0 г (65 % теор., 80 % чисті за допомогою ВЕРХ) вказаної у заголовку сполуки. Цей матеріал використовували без подальшої очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО): δ (млн.ч.) = 7,42 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 10,22 (с, 1H).

Проміжна сполука 17A

(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)(циклопропіл)метанол



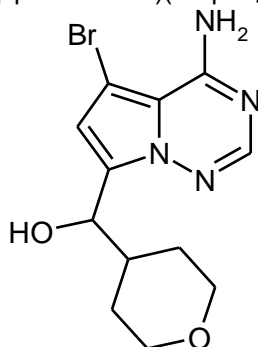
Проміжну сполуку 16A (500 мг, 1,66 ммоль) суспендували у сухому ТГФ (30 мл). При 0 °С додавали 0,5 М розчин циклопропілброміду магнію у діетиловому етері (10 мл, 5,0 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом години. Потім, додавали іншу частину розчину Грігнарда (6,6 мл, 3,3 ммоль). Після подальшого перемішування протягом 30 хв. при кімнатній температурі, реакцію гасили насиченим водним розчином хлориду амонію та екстрагували етилацетатом (2 × 20 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином, висушували над сульфатом магнію та концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4). Вихід: 0,14 г (29 % теор.).

РХ-МС (спосіб 6): R<sub>t</sub>=0,75 хв.; МС (ЕСІpos): m/z (%) = 283,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО): δ (млн.ч.) = 0,35 (м, 3H), 0,45 (м, 1H), 1,28 (м, 1H), 4,62 (т, 1H), 5,26 (д, 1H), 6,75 (с, 1H), 7,84 (с, 1H).

Проміжна сполука 18A

(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)(тетрагідро-2H-піран-4-іл)метанол



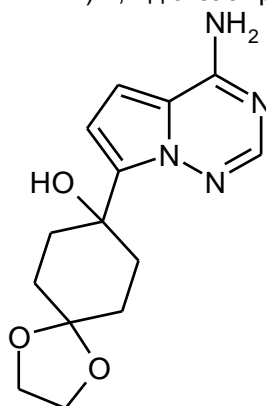
У 50 мл три-горлу колбу оснащали конденсатором, термометром та крапельною воронкою, яку продували аргонем, реагент Грігнарда одержували з стружки магнію (484 мг, 19,9 ммоль) та 4-хлортетрагідропірану (2,4 г, 19,9 ммоль) у сухому ТГФ (14 мл). До цього розчину додавали при 0 °С суспензію проміжної сполуки 16A (1,2 г, 3,98 ммоль) у ТГФ (20 мл), та реакційну суміш перемішували протягом години при кімнатній температурі. Її потім гасили насиченим водним розчином хлориду та екстрагували етилацетатом (2 × 50 мл). Органічний шар промивали

сольовим розчином, висушували над сульфатом магнію та концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 0,5 г (38 % теор.).

РХ-МС (спосіб 6):  $R_f=0,66$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 327,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 325,1 (100)  $[M-H]^-$ .

5 Проміжна сполука 19А

8-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)-1,4-діоксаспіро[4,5]декан-8-ол



Вихідний матеріал 7-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука В).

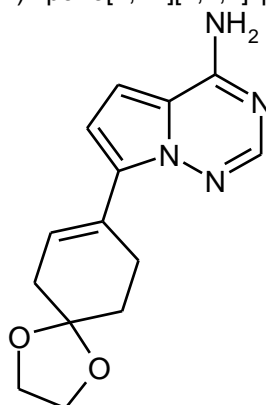
10 7-Бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (9,20 г, 35,41 ммоль) розчиняли у ТГФ (105 мл) в аргоні при кімнатній температурі. Додавали хлортриметилсилан (9,08 мл, 7,77 г, 70,82 ммоль, 2 екв.), та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год. її потім охолоджували до 0 °С, та додавали 2-пропіл магнію хлорид (74 мл 2,0 М розчину у THF, 149 ммоль, 4,2 екв.). Суміш перемішували протягом наступних 3 год. нагріваючи до кімнатної температури. Потім, додавали 1,4-діоксаспіро[4,5]декан-8-он (8,38 г, 53,12 ммоль, 1,5 екв.), та перемішування продовжували протягом ще 16 год. Реакцію гасили сумішшю 1:1 концентрованого водного розчину хлориду амонію та льоду до досягнення значення рН 6-7. Суміш екстрагували двома порціями етилацетату, та об'єднані органічні екстракти висушували над безводним карбонатом натрію та концентрували до сухого залишку. Зазначену у заголовку сполуку кристалізували з діетилового етеру. Вихід: 6,05 г (58 % теор.).

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=2,89$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_f=0,38$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 291,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 289,4 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 20А

25 7-(1,4-Ділксаспіро[4,5]дец-7-ен-8-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



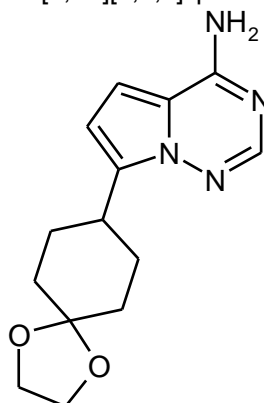
Проміжна сполука 19А (2,81 г, 60 % чистота, 5,82 ммоль) розчиняли у піридині (18 мл) при 0 °С. Трифтороцтовий ангідрид (2,46 мл, 3,66 г, 17,45 ммоль, 3 екв.) повільно додавали, та реакційну суміш перемішували при зовнішній температурі протягом 16 год. Розчинник відганяли, та залишок розділяли між водою та етилацетатом. Органічний екстракт висушували над сульфатом натрію та випаровували. Осад розтирали з діетиловим етером при 0 °С з одержанням 2,95 г (92 % чистий за допомогою ВЕРХ, 99 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=4,55$  хв.;

35 РХ-МС (спосіб 5):  $R_f=2,28$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 369,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 367,1 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 21A

7-(1,4-Ділкаспіро[4,5]дес-8-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



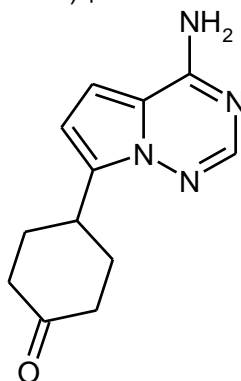
Проміжна сполука 20A (2,95 г, 10,8 ммоль) розчиняли у метанолі (1,07 л) в атмосфері аргону. Додавали паладій на вуглеці (10 %, 400 мг), та суміш ретельно перемішували протягом 24 год. в атмосфері водню при тиску зовнішнього середовища та кімнатній температурі. Каталізатор видаляли фільтруванням, та розчинник відганяли при пониженому тиску з одержанням 2,11 г (71 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,14$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,68$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 275,3 (100)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 22A

4-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)циклогексанон



Проміжна сполука 21A (2,11 г, 7,69 ммоль) розчиняли у суміші 1 М хлорводневої кислоти (23 мл) та метанолу (6,80 мл) при 0 °С та перемішували охолоджуючи на льоду протягом 3 год. Потім, значення рН встановлювали на рівні 6-7 додаванням концентрованого водного розчину бікарбонату натрію. Суміш екстрагували трьома частинами дихлорметану, та об'єднані органічні екстракти висушували над безводним сульфатом натрію, фільтрували та випаровували. Залишок (923 мг, 52 % теор.) використовували без подальшої очистки на наступній стадії синтезу.

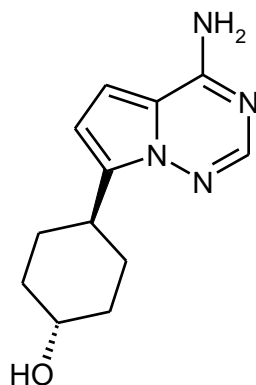
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,06$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=1,02$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 231,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 229,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,86 (ддд, 2H), 2,25-2,36 (м, 4H), 2,59 (ддд, 2H), 3,59 (м, 1H), 6,45 (д, 1H), 6,82 (д, 1H), 7,60 (ш. с, 1H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 23A

Транс-4-(4-амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)циклогексанол



Проміжну сполуку 22A (452 мг, 1,96 ммоль) розчиняли у ТГФ (15 мл), та розчин охолоджували до 0 °С. Розчин літій алюмінію гідрид (1 М у THF, 2,94 мл, 2,94 ммоль) додавали краплями. Потім, розчин перемішували при 0 °С протягом 10 хв. та потім гасили додаванням концентрованого водного розчину хлориду амонію. Суміш екстрагували 3 частинами дихлорметану, та об'єднані органічні екстракти висушували над безводним сульфатом натрію, фільтрували та випаровували. Залишок (360 мг, 77 % чистота, 61 % теор.) використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

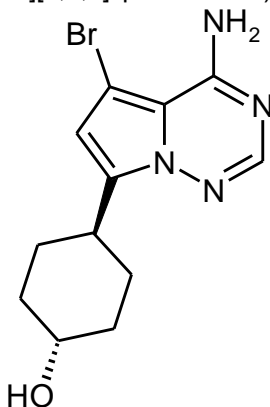
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=2,62$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,29$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 233,2 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,30 (м, 2H), 1,42 (м, 2H), 1,91 (м, 2H), 1,99 (м, 2H), 2,97 (тт, 1H), 3,45 (м, 1H), 4,60 (д, 1H), 6,39 (д, 1H), 6,79 (д, 1H), 7,53 (ш. с, 2H), 7,80 (с, 1H).

Проміжна сполука 24A

Транс-4-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)циклогексанол



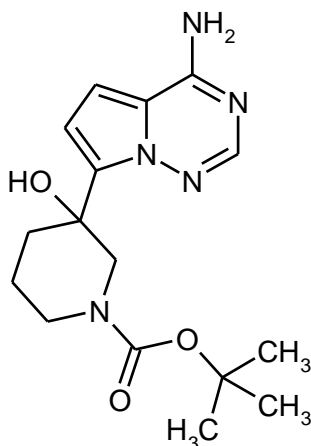
Проміжну сполуку 23A (360 мг, 85 % чистота, 1,19 ммоль) розчиняли у ТГФ (8 мл) при -20 °С, та додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (188 мг, 0,66 ммоль, 0,55 екв.). Суміш перемішували при -20 °С протягом години, потім додавали 0,5 мл концентрованого водного розчину дитіоніту натрію, та суміш екстрагували етил ацетат. Органічний екстракт висушували над безводним сульфатом натрію, фільтрували та випаровували. Неочищений продукт (463 мг, 66 % чистота, 83 % теор.) використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,22$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,03$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 311,2 and 313,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 309,2 (50) та 311,2 (40)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 25A

Трет-бутил 3-(4-амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)-3-гідроксипіперидин-1-карбоксилат



Вихідний матеріал 7-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-4-амін синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука В).

7-Бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-4-амін (17,29 г, 81 ммоль) розчиняли у ТГФ (214 мл) в аргоні при кімнатній температурі. Додавали хлортриметилсилан (20,60 мл, 17,63 г, 162 ммоль, 2 екв.), та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год. Потім, її охолоджували до 0 °С, та додавали 2-пропіл магній хлорид (170 мл 2,0 М розчину у THF, 340 ммоль, 4,2 екв.). Суміш перемішували протягом наступних 3 год. нагріваючи до кімнатної температури. Потім, додавали трет-бутил 3-охопіперидин-1-карбоксилат (25,00 г, 121 ммоль, 1,5 екв.), та перемішування продовжували протягом ще 16 год. Реакцію гасили сумішшю 1:1 концентрованого водного розчину хлориду амонію та льоду до досягнення значення pH 6-7. Суміш екстрагували двома порціями етилацетату, та об'єднані органічні екстракти висушували над безводним карбонатом натрію та концентрували до сухого залишку. Зазначену у заголовку сполуку кристалізували розтираючи в порошок залишок з діетиловим етером (50 мл). Кристали промивали діетиловим етером та висушували з одержанням 17,20 г (64 % теор.).

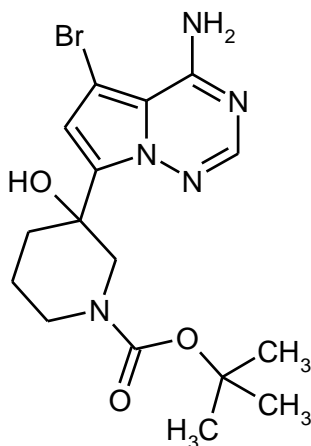
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_f=3,53$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,36$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 334,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 332,0 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,19-1,43 (м, 9H), 1,72-1,88 (м, 2H), 2,38-2,46 (м, 1H), 3,02-3,20 (м, 1H), 3,44-3,96 (м, 4H), 6,58 (д, 1H), 6,81 (д, 1H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 26A

Рац-трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл)-3-гідроксипіперидин-1-карбоксилат



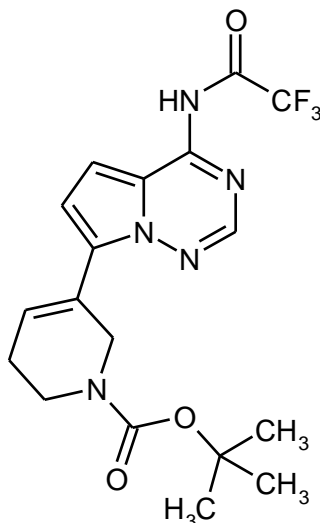
Проміжну сполуку 25A (120 мг, 0,36 ммоль) розчиняли у ТГФ (6,0 мл) при -20 °С, та додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (51 мг, 0,18 ммоль, 0,5 екв.). Суміш перемішували при -20 °С протягом 2 годин та потім гасили концентрованим водним розчином сульфату натрію (0,5 мл). Етилацетат додавали, відділяли водний шар, та органічний екстракт висушували над сульфатом натрію та випаровували. Зазначену у заголовку сполуку (148 мг, 95 % теор.) одержували у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=4,03$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,99$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 412,0 (90) та 414,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 410,0 (100) та 412,0 (85)  $[M-H]^-$ .



Проміжна сполука 27A  
Трет-бутил 5-{4-[(трифторацетил)аміно]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}-3,6-дигідропіридин-1(2H)-карбоксилат



Проміжну сполуку 25A (8,32 г, 24,95 ммоль) розчиняли у піридині (116 мл) при 0 °С. Повільно додавали трифтороцтовий ангідрид (8,81 мл, 13,10 г, 62,36 ммоль, 2,5 екв.), та реакційну суміш перемішували при зовнішній температурі протягом 16 год. Потім, її знову охолоджували до 0 °С, та 150 мл додавали діетиловий етер. Суміш перемішували при 0 °С повільно осаджуючи вказану у заголовку сполуку. Продукт наприкінці відфільтровували та промивали діетиловим етером. Фільтрат випаровували in vacuo, та залишок розтирали з діетиловим етером при 0 °С одержуючи другу партію вказаної у заголовку сполуки після промиванням діетиловим етером. Дві партії об'єднували з одержанням 7,80 г (92 % чистий за допомогою ВЕРХ, 76 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді жовтих кристалів.

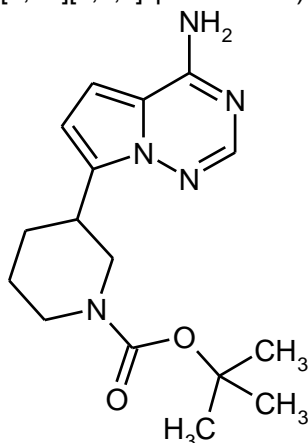
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,91$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=2,45$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 412,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 410,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,48 (с, 9H), 1,92 (м, 2H), 3,58 (м, 2H), 6,90 (д, 1H), 7,30 (д, 1H), 8,03-8,10 (м, 1H), 8,42 (с, 1H).

Проміжна сполука 28A

Рац-трет-бутил 3-(4-амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилат



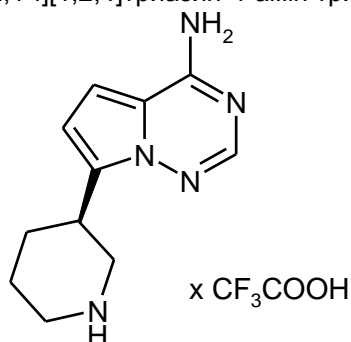
Проміжну сполуку 27A (7,80 г, 92 % чистота, 17,54 ммоль) розчиняли у метанолі (400 мл). Додавали трифтороцтову кислоту (6,76 мл, 10,0 г, 88 ммоль, 5 екв.), воду (3,16 мл, 175 ммоль, 10 екв.) та 10 % паладію на вугіллі (30 мг), та суміш гідрували протягом 24 год. при кімнатній температурі та тиску зовнішнього середовища. Каталізатор потім видаляли фільтруванням, та розчинник випаровували in vacuo. Неочищений продукт (8,79 г, 75 % чистий, кількісний вихід) використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,64$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,26$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 318,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 316,4 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 29A

7-[(3R)-Піперидин-3-іл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін трифторацетат



Вихідний матеріал бензил (R)-3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилат був описаний у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука DDD).

1,50 г (3,49 ммоль) цього матеріалу гідрували протягом 16 год. при кімнатній температурі та тиску зовнішнього середовища в присутності 10 % паладію на вугіллі (30 мг) у суміші метанолу (50 мл) та трифтороцтової кислоти (2,70 мл). Потім, каталізатор видаляли фільтруванням, та всі летючі речовини випаровували у вакуумі з одержанням 1,10 г (95 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

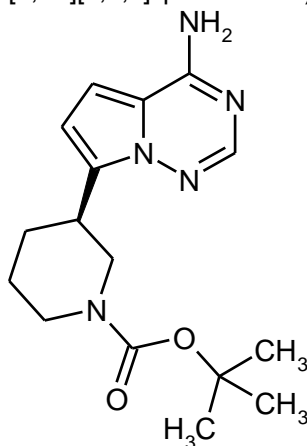
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,17$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,17$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 218 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,75 (м, 2H), 1,92 (м, 1H), 2,05 (м, 1H), 2,93 (м, 1H), 3,06 (м, 1H), 3,31 (д, 1H), 3,50 (д, 1H), 3,57 (м, 1H), 6,78 (д, 1H), 7,20 (м, 1H), 8,10 (с, 1H), 8,63 (м, 1H), 8,82 (м, 1H), 9,02 (ш. с, 1H).

Проміжна сполука 30A

Трет-бутил (3R)-3-(4-амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилат



Проміжну сполуку 29A (1,10 г, 5,06 ммоль) суспендували у дихлорметані (6,60 мл), додавали триетиламін (1,55 мл, 1,13 г, 11,14 ммоль, 2,20 екв.), та суміш перемішували протягом 30 хв. до повного розчинення вихідного матеріалу. Потім, додавали ди-трет-бутил дикарбонат (1,22 г, 5,57 ммоль, 1,1 екв.), та реакційну суміш перемішували протягом 16 год. Потім, додавали 5 % водну лимонну кислоту, фази розділяли, та органічний шар висушували над сульфатом натрію та випаровували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 595 мг (37 % теор.).

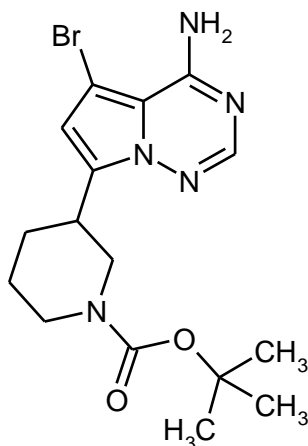
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=4,01$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,54$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 318,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 316,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,38 (с, 9H), 1,45 (м, 2H), 1,72 (м, 2H), 2,02 (м, 2H), 2,90 (м, 1H), 3,17 (м, 1H), 3,85 (м, 1H), 4,08 (м, 1H), 6,47 (д, 1H), 6,80 (д, 1H), 7,58 (ш. с, 1H), 7,81 (с, 1H).

Проміжна сполука 31A

Рац-трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилат



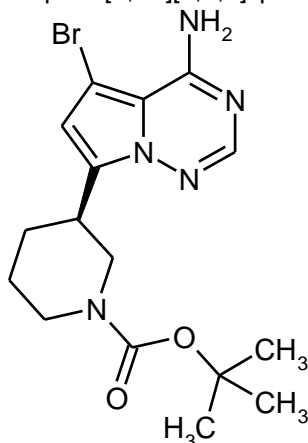
Проміжну сполуку 28A (8,28 г, 75 % чистота, 14,39 ммоль) розчиняли у ТГФ (222 мл) при -20 °С, та додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (2,06 г, 7,19 ммоль, 0,5 екв.). Суміш перемішували при -20 °С протягом 2 годин та потім гасили концентрованим водним розчином сульфату натрію (0,5 мл). Додавали етилацетат, відділяли водний шар, та органічний екстракт висушували над сульфатом натрію та випаровували. Зазначену у заголовку сполуку (6,30 г, 86 % теор.) одержували у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

РХ-МС (спосіб 5):  $R_f=2,27$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 396,0 (80) та 397,9 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 394,0 (90) та 396,0 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,35 (с, 9H), 1,40-1,44 (м, 2H), 1,71 (м, 1H), 1,98 (м, 1H), 2,95 (м, 1H), 3,20 (м, 1H), 3,75 (м, 1H), 4,00 (м, 1H), 6,67 (с, 1H), 7,86 (с, 1H).

Проміжна сполука 32A

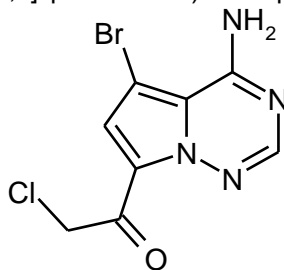
Трет-бутил (3R)-3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилат



Зазначену у заголовку сполуку одержували таким же чином як рацемічну суміш (Проміжна сполука 31A), починаючи з проміжної сполуки 30A. Аналітичні дані були ідентичними з тими, що отримані для Проміжної сполуки 31A.

Проміжна сполука 33A

1-(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)-2-хлоретанон



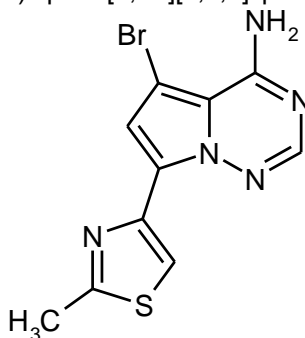
Сполуку одержували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука N, стадія 1).

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=4,27$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_f=1,70$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 289,0 (75) та 290,9 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 287,0 (75) та 288,9 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 34A

5-Бром-7-(2-метил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін

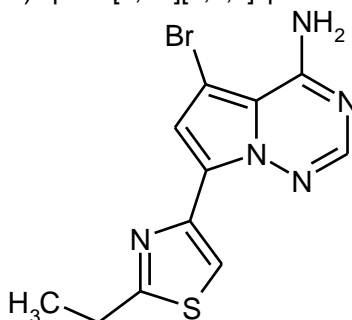


Проміжну сполуку 33A (100 мг, 0,35 ммоль) та тіоацеамід (30 мг, 0,40 ммоль, 1,15 екв.) розчиняли у 1,4-діоксані (3,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 130 °С протягом 60 хв. у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, розчинник відганяли, та залишок розтирали з ацетонітрилом та фільтрували. Фільтрат викидали. Зазначену у заголовку сполуку виділяли у вигляді кристалічної твердої речовини. Вихід: 99 мг (92 % теор.).

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=4,00$  хв.;РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,05$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 310,0 (90) та 312 (100)  $[M+H]^+$ . $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,71 (с, 3H), 7,20 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 8,28 (с, 1H).

Проміжна сполука 35A

5-Бром-7-(2-етил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін

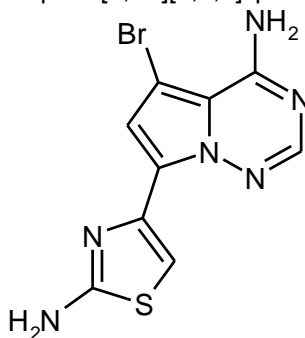


Проміжну сполуку 33A (100 мг, 0,35 ммоль) та тіопропіонамід (32 мг, 0,36 ммоль, 1,05 екв.) кип'ятили із зворотнім холодильником у етанолі (3,0 мл) протягом 4,5 год. Після охолодження, суміш розділяли між етилацетатом та водним розчином бікарбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли. Продукт висушували у вакуумі з одержанням 91 мг (0,28 ммоль, 81 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді майже-білої твердої речовини.

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_f=4,30$  хв.;РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,84$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 324,2 (100) та 325,8 (98)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 36A

7-(2-Аміно-1,3-тіазол-4-іл)-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



Проміжну сполуку 33A (100 мг, 0,35 ммоль) та тіосечовину (32 мг, 0,41 ммоль, 1,2 екв.) суспендували у 1,4-діоксані (3 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки, яку потім закривали ізолюючою кришкою. Суміш нагрівали до 120 °С протягом 60 хв. у одномодовій мікрохвильовій пічці. Під час охолодження, додавали воду, та одержаний осад збирали

фільтруванням та промивали діоксаном. Майже-білу тверду речовину висушували у вакуумі з одержанням 98 мг (91 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

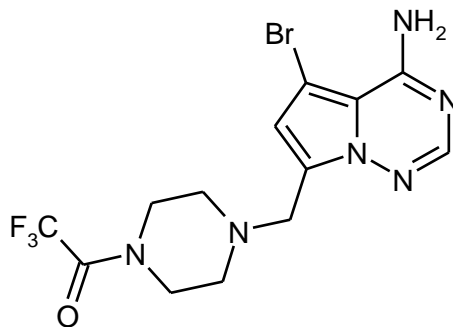
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,19$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,25$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 310,9 (95) та 312,9 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 309,0 (100) та 310,9 (70)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 7,17 (с, 1H), 7,52 (с, 1H), 8,07 (с, 1H).

Проміжна сполука 37A

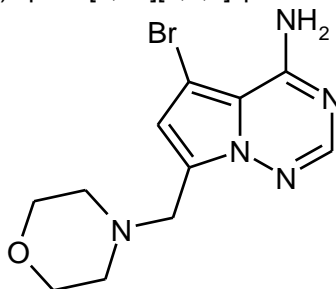
1-{4-[(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піперазин-1-іл}-2,2,2-трифторетанон



Сполуку одержували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Приклад 416, стадія 6).

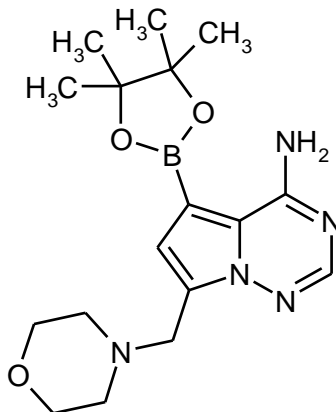
Проміжна сполука 38A

5-Бром-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



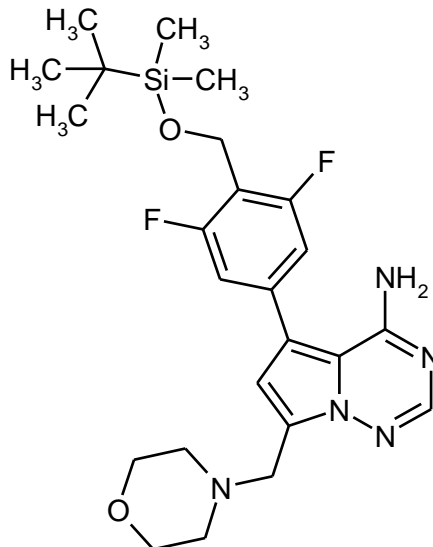
Сполуку одержували за процедурою, описаною у WO 2007/064931-A2 (Проміжна сполука C). Проміжна сполука 39A

7-(Морфолін-4-ілметил)-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



До розчину проміжної сполуки 38A (5,59 г, 17,9 ммоль) та біс(пінаcolato)дибору (10,0 г, 39,4 ммоль) у дегазованому ДМФ (120 мл) додавали в атмосфері аргону 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-паладію(II) хлорид (786 мг, 1,07 ммоль) та ацетат калію (7,03 г, 71,6 ммоль). Суміш нагрівали до 80 °C протягом 5 год. та потім охолоджували до кімнатної температури. Додавали трет-бутилметилловий етер (100 мл), та суспензію фільтрували. Фільтрат випаровували до сухого залишку при пониженому тиску, та залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі (градієнт елювання 2-5 % метанол у дихлорметані) з одержанням 1,30 г (20 % теор.) вказаної у заголовку сполуки, що містила деякі з відповідних похідних боронової кислоти. Цей продукт використовували без подальшої очистки.

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,73$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 360,3 (30)  $[M+H]^+$ .  
Проміжна сполука 40А  
5-[4-({[трет-бутил(диметил)силіл]окси}метил)-3,5-дифторфеніл]-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-4-амін



5

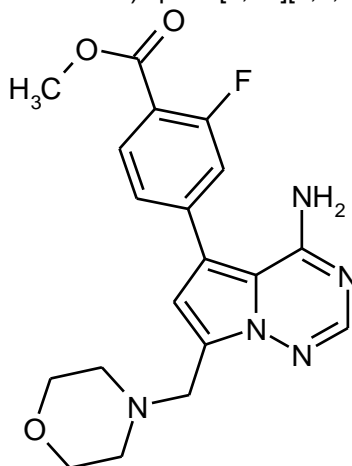
Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 38А (200 мг, 0,64 ммоль) та [4-({[трет-бутил(диметил)силіл]окси}метил)-3,5-дифторфеніл]боронової кислоти (314 мг, 0,77 ммоль, 74 % чистота; одержаний за способом Hattori, Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3258-3262). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 110 мг (32 % теор., РХ-МС чистота 92 %).

10

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,18$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 490,1 (30)  $[M+H]^+$ , МС (ЕСIneg):  $m/z$  (%) = 488,3 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 41А

Метил 4-[4-аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-фторбензоат



15

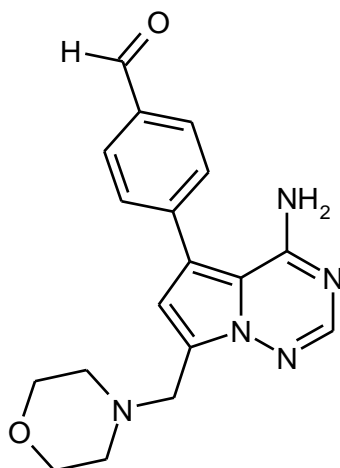
Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 38А (200 мг, 0,64 ммоль) та [3-фтор-4-(метоксикарбоніл)феніл]боронової кислоти (139 мг, 0,71 ммоль). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 80 мг (32 % теор.).

20

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,66$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 386,1 (80)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 42А

4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]бензальдегід

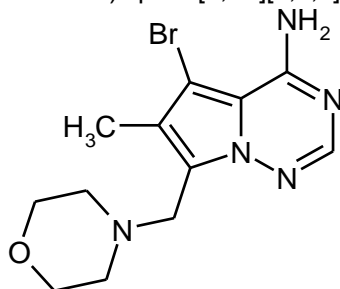


До розчину проміжної сполуки 38A (300 мг, 0,96 ммоль) у дегазованому ДМФ (9,0 мл) додавали (4-формілфеніл)боронову кислоту (216 мг, 1,44 ммоль), тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (111 мг, 0,1 ммоль) та 2 М водний розчин карбонату натрію (2,4 мл). Суміш нагрівали до 90 °С в аргоні протягом 17 год., потім охолоджували до кімнатної температури та безпосередньо очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 150 мг (46 % теор.).

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,44$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 338,2 (30)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 43A

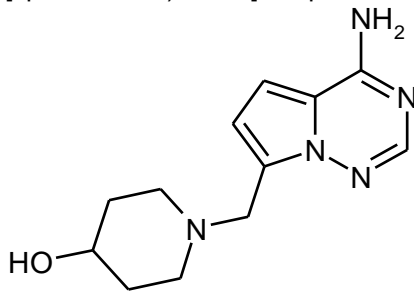
5-Бром-6-метил-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-f][1,2,4]тріазин-4-амін



Сполуку одержували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука О).

Проміжна сполука 44A

1-[(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]тріазин-7-іл)метил]піперидин-4-ол



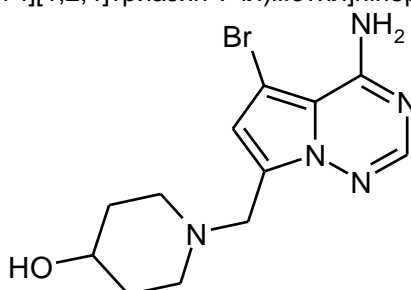
4-Гідроксипіперидин (3,62 г, 35,8 ммоль) та 37 % розчин формаліну (2,9 г, 35,8 ммоль) розчиняли у оцтовій кислоті (150 мл) та перемішували при кімнатній температурі протягом години. До цього розчину додавали розчин піроло[2,1-f][1,2,4]тріазин-4-аміну (2,0 г, 14,9 ммоль; одержаний за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2, Проміжна сполука А) у оцтовій кислоті (150 мл), та суміш перемішували при 60 °С протягом 2 год. Розчинник потім випаровували, та залишок відбирали у 200 мл напів-концентрованого водного розчину бікарбонату калію та екстрагували 200 мл дихлорметану. Органічний шар промивали водою (2 × 50 мл) та викидали. Об'єднані водні шари випаровували до сухого залишку, та залишок обробляли 10:1 сумішшю дихлорметану та метанолу (2 × 100 мл). Органічні екстракти випаровували, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4) з одержанням 1,16 г (15 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=0,18$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 248,3 (30)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 246,5 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,35 (ш. м, 2H), 1,67 (ш. м, 2H), 2,07 (т, 2H), 2,70 (ш. м, 2H), 3,38 (ш. м, 1H), 3,75 (с, 2H), 4,51 (ш, 1H), 6,52 (д, 1H), 6,84 (д, 1H), 7,62 (ш, 2H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 45A

5 1-[(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піперидин-4-ол



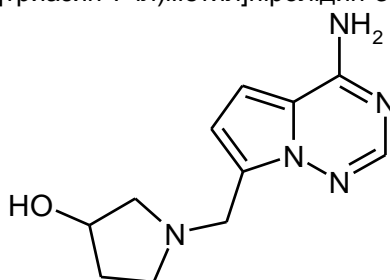
Проміжну сполуку 44A (1,10 г, 4,45 ммоль) розчиняли у ДМФ (16,5 мл) та охолоджували до -20 °С. 1,3-Дибром-5,5-диметилгідантоїн (636 мг, 2,22 ммоль) додавали кожні 10 хв. частинами по приблизно 100 мг. Потім, суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ще години та потім безпосередньо очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4). Вихід: 0,61 г (42 % теор.).

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,75$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 326,0 (30)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 324,0 (100)  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,35 (ш. м, 2H), 1,67 (ш. м, 2H), 2,08 (т, 2H), 2,68 (ш. м, 2H), 3,39 (ш. м, 1H), 3,74 (с, 2H), 4,51 (ш, 1H), 6,69 (с, 1H), 7,86 (с, 1H).

Проміжна сполука 46A

15 1-[(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піролідин-3-ол



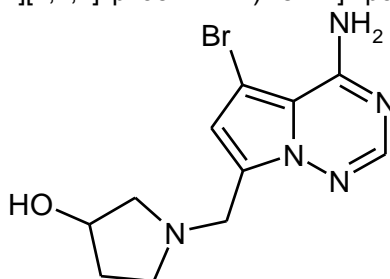
3-Піролідinol (1,56 г, 17,9 ммоль) та 37 % розчину формаліну (1,45 г, 17,9 ммоль) розчиняли у оцтовій кислоті (75 мл) та перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хв. До цього розчину додавали розчин піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну (2,0 г, 14,9 ммоль) у оцтовій кислоті (75 мл), та суміш перемішували при 60 °С протягом 4 год. Після випаровування, залишок відбирали у 200 мл 1 N водного розчину карбонату калію та екстрагували етилацетатом (3 × 200 мл). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином, висушували над сульфатом магнію та концентрували при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4) з одержанням 390 мг (11 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,22$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 234,2 (20)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 223,0 (100)  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,50 (ш. м, 1H), 1,94 (м, 1H), 2,34 (дд, 1H), 2,44 (дд, 1H), 2,60 (дд, 1H), 2,71 (дд, 1H), 3,84 (дд, 2H), 4,15 (ш, 1H), 4,65 (д, 1H), 6,52 (д, 1H), 6,83 (д, 1H), 7,61 (ш, 2H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 47A

30 1-[(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піролідин-3-ол



Проміжну сполуку 46A (0,9 г, 3,86 ммоль) розчиняли у ДМФ (14,2 мл) та охолоджували до -



20 °C. 1,3-Дибром-5,5-диметилгідантоїн (606 мг, 2,12 ммоль) додавали кожні 10 хв. частинами по приблизно 100 мг, та перемішування продовжували при кімнатній температурі протягом години. Суміш розділяли між 10 % водного розчину бікарбонату калію (50 мл) та етилацетатом (100 мл). Водний шар екстрагували іншою порцією етилацетату (100 мл) та потім

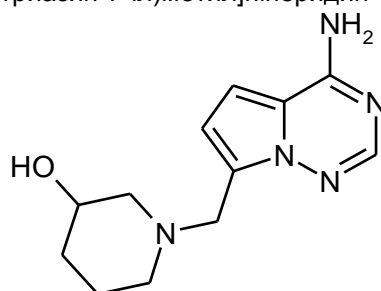
дихлорметаном (100 мл). Об'єднані органічні шари висушували над сульфатом магнію та випаровували, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4). Вихід: 0,44 г (37 % теор.).

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,21$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 314,0 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,50 (ш. м, 1H), 1,95 (м, 1H), 2,34 (дд, 1H), 2,45 (м, 1H), 2,60 (м, 1H), 2,70 (дд, 1H), 3,84 (дд, 2H), 4,15 (ш, 1H), 4,65 (д, 1H), 6,71 (с, 1H), 7,86 (с, 1H).

Проміжна сполука 48А

1-[(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піперидин-3-ол



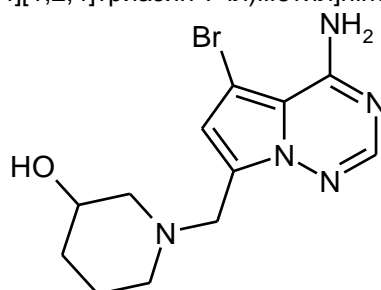
Зазначену у заголовку сполуку одержували по аналогії з Проміжною сполукою 46А з 3-гідроксіпіперидину (1,80 г, 17,9 ммоль) як вихідного матеріалу. Після концентрування реакційної суміші, залишок відбирали у насиченому водному розчині карбонату калію та екстрагували 300 мл дихлорметану. Органічний шар промивали сольовим розчином, висушували над сульфатом магнію та концентрували при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4) з одержанням 650 мг (18 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,16$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 248,2 (60)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,99 (м, 1H), 1,37 (ш. м, 1H), 1,57 (ш. м, 1H), 1,74 (м, 2H), 1,88 (т, 1H), 2,68 (ш. м, 1H), 2,83 (ш. дд, 1H), 3,41 (ш. м, 1H), 3,78 (дд, 2H), 4,54 (д, 1H), 6,52 (д, 1H), 6,84 (д, 1H), 7,61 (ш, 2H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 49А

1-[(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил]піперидин-3-ол



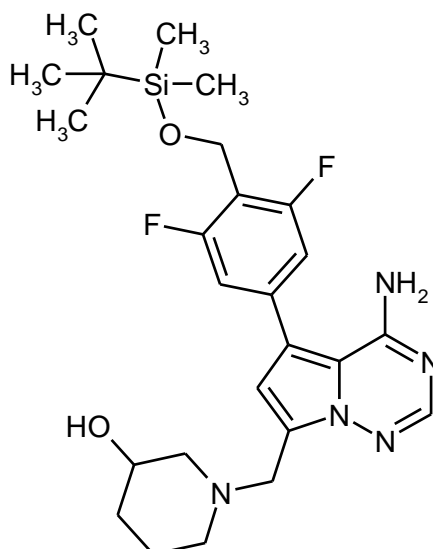
По аналогії з одержанням проміжної сполуки 47А, вказану у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 48А (690 мг, 2,79 ммоль) з одержанням 348 мг (93 % РХ-МС чистота, 36 % теор.) продукту після очистки препаративною ВЕРХ (спосіб 4).

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,85$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 226,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 223,9 (70)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,99 (м, 1H), 1,37 (м, 1H), 1,57 (ш. м, 1H), 1,74 (м, 2H), 1,89 (м, 1H), 2,66 (ш. м, 1H), 2,81 (ш. м, 1H), 3,41 (ш. м, 1H), 3,77 (дд, 2H), 4,54 (д, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,86 (с, 1H).

Проміжна сполука 50А

1-({4-Аміно-5-[4-({трет-бутил(диметил)силіл)окси}метил]-3,5-дифторфеніл}піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)метил)піперидин-3-ол



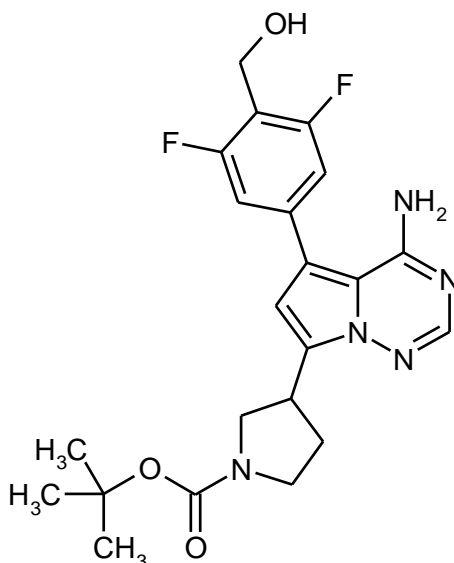
Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 49A (200 мг, 0,61 ммоль) та [4-({трет-бутил(диметил)силіл}окси)метил]-3,5-дифторфеніл]боронової кислоти (222 мг, 0,74 ммоль; одержаний за способом Хаторі, Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3258-3262). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 153 мг (50 % теор.).

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,55$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 504,1 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,11 (с, 6H), 0,86 (с, 9H), 1,01 (м, 1H), 1,40 (ш. м, 1H), 1,59 (ш. м, 1H), 1,77 (м, 2H), 1,94 (м, 1H), 2,72 (ш. м, 1H), 2,87 (ш. м, 1H), 3,43 (м, 1H), 3,82 (дд, 2H), 4,55 (д, 1H), 4,74 (с, 2H), 6,75 (с, 1H), 7,18 (дд, 2H), 7,95 (с, 1H).

Проміжна сполука 51A

Рац-трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піролідін-1-карбоксилат



Одержання вихідного матеріалу трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піролідін-1-карбоксилату було описано у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука I).

Цю сполуку (60 мг, 0,16 ммоль) конденсували за загальним способом синтезу 1 з Проміжною сполукою 2A (47 мг, 0,17 ммоль, 1,1 екв.). Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 67 мг (84 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

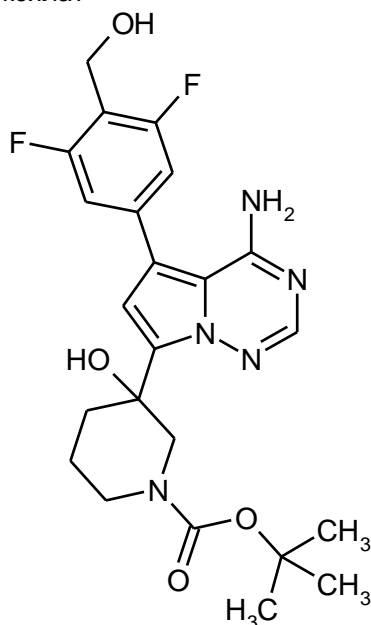
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=4,08$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,66$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 446,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 444,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,39 (с, 9H), 2,10 (м, 1H), 2,33 (м, 1H), 3,37 (м, 2H), 3,46 (м, 1H), 3,70-3,89 (м, 2H), 4,51 (с, 2H), 6,80 (с, 1H), 7,15 (м, 2H), 8,03 (с, 1H).

Проміжна сполука 52A

Рац-трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}-3-гідроксипіперидин-1-карбоксилат



Проміжну сполуку 26A (148 мг, 0,35 ммоль) та (4-бром-2,6-дифторфеніл)метанол (75 мг, 0,34 ммоль) конденсували за загальним способом синтезу 2. Очистку неочищеного продукту здійснювали, використовуючи препаративну ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 46 мг (28 % теор.).

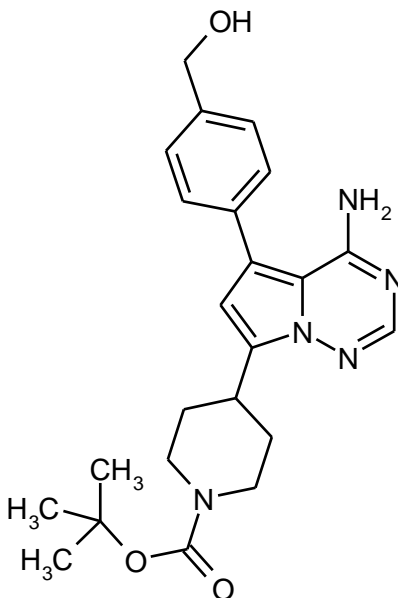
ВЕРХ (спосіб 3):  $R_f=3,90$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,56$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 476,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 474,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,22-1,58 (м, 10H), 1,80 (м, 2H), 3,19 (м, 1H), 3,48 (м, 1H), 3,62 (м, 1H), 3,74 (м, 1H), 4,00 (м, 1H), 4,52 (м, 2H), 5,39 (т, 1H), 6,78 (с, 1H), 7,10 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

Проміжна сполука 53A

Трет-бутил 4-{4-аміно-5-[4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



Вихідний матеріал трет-бутил 4-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піперидин-1-карбоксилату одержували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Приклад 1, стадія 3).

Ця сполука (400 мг, 1,01 ммоль) потім реагувала з 4-(гідроксиметил)фенілбороною кислотою (184 мг, 1,21 ммоль, 1,2 екв.) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 326 мг (76 % теор.) вказаної у заголовку

сполуки.

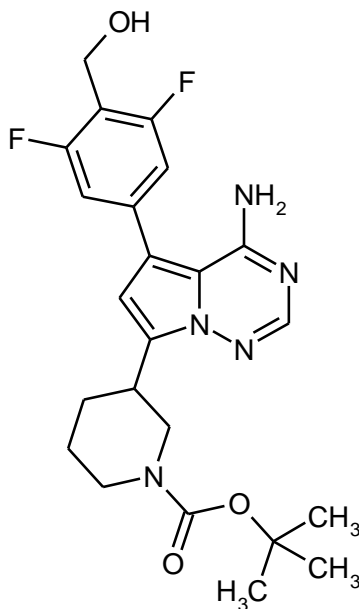
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=4,07$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,06$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 424,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 422,3 (100)  $[M-H]^-$ .

5  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,52-1,65 (м, 2H), 1,92-2,00 (м, 2H), 2,89 (ш. с, 2H), 3,10 (м, 1H), 3,28-3,37 (м, 2H), 4,06 (д, 2H), 4,60 (с, 2H), 6,68 (с, 1H), 7,47 (с, 5H), 8,02 (с, 1H).

Проміжна сполука 54A

Рац-трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



10

Проміжна сполука 31A (200 мг, 0,39 ммоль) та Проміжна сполука 2A (138 мг, 0,51 ммоль, 1,3 екв.) реагувала за загальним способом синтезу 1 з виходом 130 мг (72 % теор.) вказаної у заголовку сполуки після очистки препаративною ВЕРХ (спосіб 2).

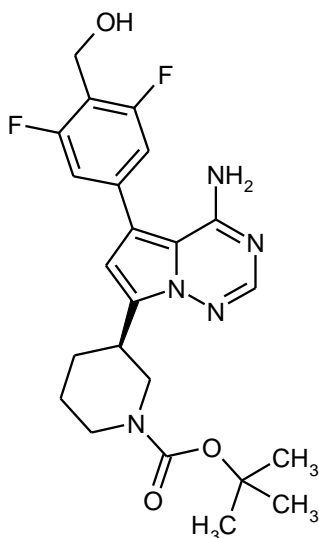
ВЕРХ (спосіб 3):  $R_t=4,23$  хв.;

15 РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,17$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 460,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 458,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,39 (с, 9H), 1,48 (м, 2H), 1,74 (м, 2H), 2,93 (м, 1H), 3,22 (м, 1H), 3,85 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 4,53 (с, 2H), 6,78 (с, 1H), 7,12 (м, 2H), 8,02 (с, 1H).

Проміжна сполука 55A

20 Трет-бутил (3R)-3-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



25

Енантіомерно чистий R-ізомер синтезували конденсуванням Проміжної сполуки 32A (115 мг, 0,28 ммоль) з (4-бром-2,6-дифторфеніл)метанолом (76 мг, 0,33 ммоль, 1,2 екв.) за загальним способом синтезу 2. Вихід: 48 мг (38 % теор.).

Альтернативно, вказану у заголовку сполуку одержували розділенням рацемічної сполуки від Проміжної сполуки 54A (40 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ [колонка: хіральна фаза силікагелю на основі селектору полі(N-метакрилоїл-L-лейцин-трет-бутиламіду), 250 мм × 20 мм; елюент: етил ацетат/ізогексан 4:1; швидкість потоку: 20 мл/хв.; УФ виявлення: 260 нм]. Вихід: 20 мг (R-ізомер).

Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: хіральна фаза силікагелю на основі селектору полі(N-метакрилоїл-L-лейцин-трет-бутиламіду), 250 мм × 4 мм; елюент: етил ацетат/ізогексан 4:1; швидкість потоку: 1 мл/хв.; УФ виявлення: 260 нм]:  $R_t=5,68$  хв.; е.н. >99,5.

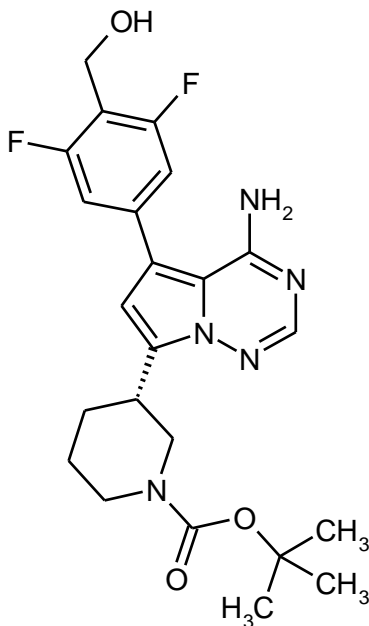
ВЕРХ (спосіб 3):  $R_t=4,23$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,17$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 460,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 458,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,39 (с, 9H), 1,48 (м, 2H), 1,74 (м, 2H), 2,93 (м, 1H), 3,22 (м, 1H), 3,85 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 4,53 (с, 2H), 6,78 (с, 1H), 7,12 (м, 2H), 8,02 (с, 1H).

Проміжна сполука 56A

Трет-бутил (3S)-3-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



Енантіомерно чистий S-ізомер одержували шляхом відділення рацемічної сполуки від Проміжної сполуки 54A (40 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ як описано для Проміжної сполуки 55A. Вихід: 19 мг (S-ізомер).

Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: хіральна фаза силікагелю на основі селектору полі(N-метакрилоїл-L-лейцин-трет-бутиламіду), 250 мм × 4 мм; елюент: етил ацетат/ізогексан 4:1; швидкість потоку: 1 мл/хв.; УФ виявлення: 260 нм]:  $R_t=7,87$  хв.; е.н. >99,5.

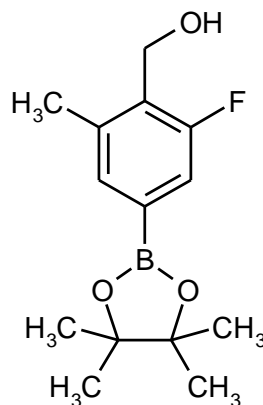
ВЕРХ (спосіб 3):  $R_t=4,23$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,17$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 460,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 458,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,39 (с, 9H), 1,48 (м, 2H), 1,74 (м, 2H), 2,93 (м, 1H), 3,22 (м, 1H), 3,85 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 4,53 (с, 2H), 6,78 (с, 1H), 7,12 (м, 2H), 8,02 (с, 1H).

Проміжна сполука 57A

[2-Фтор-6-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл]метанол

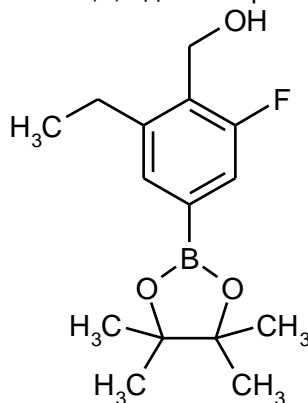


(4-Бром-2-фтор-6-метилфеніл)метанол (2,0 г, 9,13 ммоль) розчиняли у 1,4-діоксані (20,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки, та розчин промивали аргоном. Потім, додавали біс(пінаколато)дибор (2,43 г, 9,59 ммоль), 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-паладію(II) хлорид (298 мг, 0,37 ммоль) та ацетат калію (1,34 г, 13,7 ммоль), реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 130 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, реакційну суміш фільтрували та фільтрат випаровували. Залишок обробляли циклогексаном (100 мл) та перемішували протягом 10 хв. Розчин знову фільтрували, фільтрат випаровували, та залишок очищали хроматографією (Biotage 25M кварцовий картридж, дихлорметан при швидкості потоку 15 мл/хв.). фракції, що містили вказану у заголовку сполуку, об'єднували та випаровували, та вказану у заголовку сполуку кристалізували спонтанно у вигляді жовтої твердої речовини (2,18 г, 90 % теор.).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,30 (с, 12H), 2,39 (с, 3H), 4,51 (м, 2H), 5,01 (т, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,31 (с, 1H).

Проміжна сполука 58A

[2-Етил-6-фтор-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл]метанол

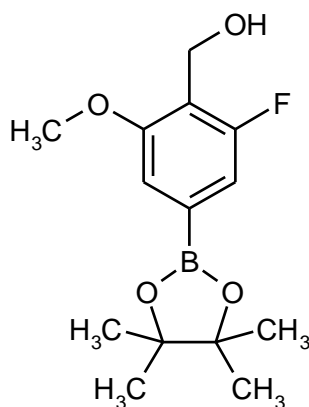


Зазначену у заголовку сполуку синтезували та очищали по аналогії з Проміжною сполукою 57A, використовуючи (4-бром-2-етил-6-фторфеніл)метанол (2,00 г, 8,58 ммоль), біс(пінаколато)дибор (2,29 г, 9,01 ммоль), 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-паладію(II) хлорид (280 мг, 0,34 ммоль) та ацетат калію (1,26 г, 12,87 ммоль) у 1,4-діоксані (20 мл). Вихід: 2,16 г (90 % теор.) у вигляді жовтих кристалів.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,17 (т, 3H), 1,30 (с, 12H), 2,76 (к, 2H), 4,50 (м, 2H), 5,03 (т, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,32 (с, 1H).

Проміжна сполука 59A

[2-Фтор-6-метокси-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл]метанол

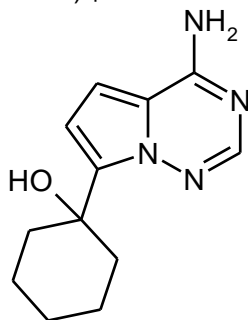


Зазначену у заголовку сполуку синтезували та очищали по аналогії з Проміжною сполукою 57A, використовуючи (4-бром-2-метокси-6-фторфеніл)метанол (2,00 г, 8,51 ммоль), біс(пінаcolato)дибор (2,27 г, 8,90 ммоль), 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-паладію(II) хлорид (278 мг, 0,34 ммоль) та ацетат калію (1,25 г, 12,76 ммоль) у 1,4-діоксані (20 мл). Вихід: 1,81 г (75 % теор.) у вигляді жовтих кристалів.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,30 (с, 12H), 3,83 (с, 3H), 4,47 (м, 2H), 4,86 (т, 1H), 6,97 (д, 1H), 7,02 (с, 1H).

Проміжна сполука 60A

1-(4-Амінопіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)циклогексанол



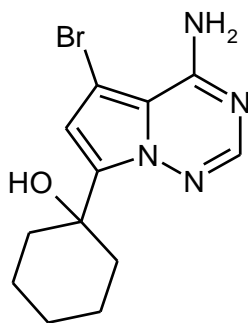
7-Бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (1,20 г, 5,63 ммоль) розчиняли у ТГФ (25 мл) в аргоні при кімнатній температурі. Додавали хлортриметилсилан (1,43 мл, 11,27 ммоль), та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год. Потім, її охолоджували до 0 °С, додавали 2-пропіл магній хлорид (11,8 мл 2,0 М розчину у THF, 23,7 ммоль), та перемішування продовжували протягом ще 3 год., поки реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури. Потім, додавали циклогексанон (0,88 мл, 8,45 ммоль), та перемішування продовжували протягом 16 год. Реакцію гасили сумішшю (1:1) концентрованого водного розчину хлориду амонію та льоду до досягнення рН 6-7. Суміш екстрагували двома порціями етилацетату, та об'єднані органічні екстракти висушували над безводним карбонатом натрію та концентрували до сухого залишку. Продукт одержаний таким чином використовували без подальшої очистки (чистота ~68 % за допомогою ВЕРХ). Вихід: 1,87 г (97 % теор.).

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t$ =1,10 хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 233 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 231 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,28-1,33 (м, 1H), 1,42-1,50 (м, 2H), 1,58-1,63 (м, 1H), 1,67-1,78 (м, 4H), 2,13-2,23 (м, 2H), 6,69 (д, 1H), 7,20 (д, 1H), 8,02 (с, 1H), 8,58 (ш. с, 1H), 9,00 (ш. с, 1H).

Проміжна сполука 61A

1-(4-Аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)циклогексанол



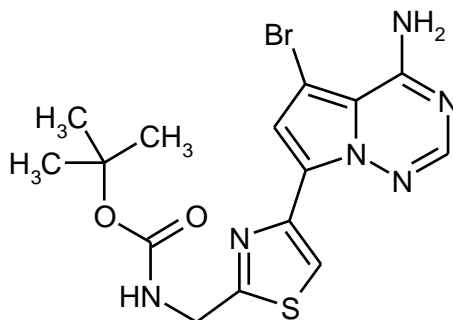
Проміжна сполука 60A (80 мг, 0,34 ммоль) розчиняли у ТГФ (5,0 мл), та суміш охолоджували до -20 °С. Відразу ж додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (49 мг, 0,17 ммоль), та перемішування продовжували протягом години. Реакцію гасили конц. водним розчином дитіоніту натрію (0,5 мл), та суміш екстрагували етилацетатом. Органічний екстракт промивали сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 98 мг (91 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

PX-МС (спосіб 4):  $R_t=1,90$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 311 (95)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 309 (90)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,20-1,33 (м, 1H), 1,42-1,52 (м, 2H), 1,58-1,78 (м, 5H), 2,15-2,23 (м, 2H), 5,01 (ш. с, 2H), 6,63 (с, 1H), 7,82 (с, 1H).

Проміжна сполука 62A

Трет-бутил  $\{[4-(4\text{-аміно-5-бромпіроло}[2,1\text{-}f][1,2,4]\text{триазин-7-іл}]-1,3\text{-тіазол-2-іл}\}$ метилкарбамат



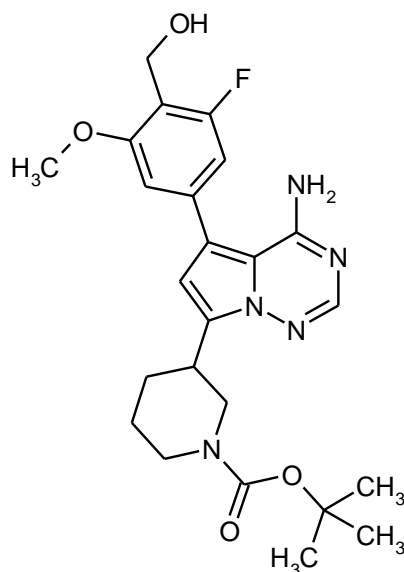
Проміжну сполуку 33A (109 мг, 0,38 ммоль) та трет-бутил (2-аміно-2-тіоксоетил)карбамат (79 мг, 0,41 ммоль) розчиняли у етанолі (6,5 мл). Суміш кип'ятили із зворотнім холодильником протягом 20 год. Суміш потім фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок розтирали з ацетонітрилом з одержанням 67 мг (42 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді коричневатого-сірої кристалічної твердої речовини.

PX-МС (спосіб 7):  $R_t=1,81$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 425 (80) та 427 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 423 (50) та 425 (100)  $[M-H]^-$ .

Проміжна сполука 63A

Трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3-фтор-4-(гідроксиметил)-5-метоксифеніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат





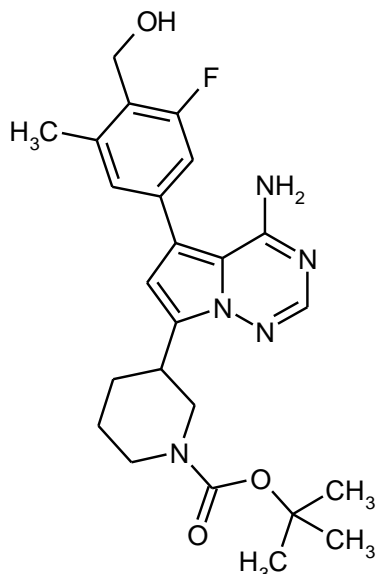
Проміжну сполуку 31A (120 мг, 0,30 ммоль) та Проміжну сполуку 59A (104 мг, 0,36 ммоль) розчиняли у ацетонітрилі (2,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргонном. Тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (35 мг, 0,03 ммоль) та 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,5 мл) додавали, та суміш нагрівали до 150 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage 25M кварцовий картридж, дихлорметан + 2-5 % метанол, швидкість потоку 10 мл/хв.) з одержанням 51 мг (36 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

PX-МС (спосіб 6):  $R_t=1,16$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 472 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 470 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,31-2,10 (м, 13H), 2,88-2,91 (м, 2H), 3,19-3,27 (м, 2H), 3,87 (с, 1H), 4,12 (м, 1H), 4,50 (м, 1H), 4,82 (т, 1H), 6,68 (с, 1H), 6,83 (д, 1H), 6,90 (с, 1H), 7,92 (с, 1H).

Проміжна сполука 64A

Трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3-фтор-4-(гідроксиметил)-5-метилфеніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



Проміжну сполуку 31A (120 мг, 0,30 ммоль) та Проміжну сполуку 57A (97 мг, 0,36 ммоль) розчиняли у ацетонітрилі (2,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргонном. Додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (35 мг, 0,03 ммоль) та 2,0 М водний розчин карбонату натрію (0,5 мл), та суміш нагрівали до 150 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage 25M кварцовий картридж, дихлорметан + 2-5 % метанол, швидкість потоку 10 мл/хв.) з одержанням 110 мг (71 % теор.) вказаної у заголовку

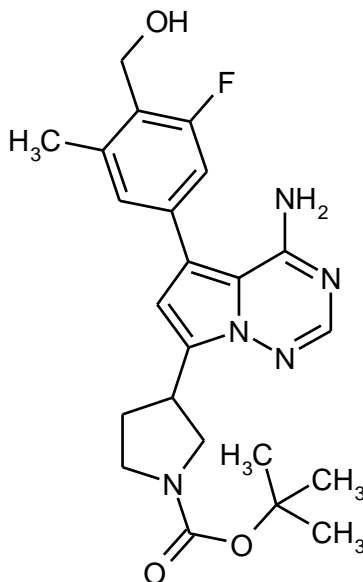
сполуки.

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=2,03$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 456 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 454 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,31-2,11 (м, 13H), 2,42 (с, 3H), 2,88-2,91 (м, 2H), 3,17-3,30 (м, 2H), 3,80 (м, 1H), 4,54 (м, 1H), 4,82 (т, 1H), 6,64 (с, 1H), 7,04 (д, 1H), 7,12 (с, 1H), 7,93 (с, 1H).

Проміжна сполука 65A

Трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3-фтор-4-(гідроксиметил)-5-метилфеніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піролідин-1-карбоксилат



Вихідний матеріал трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піролідин-1-карбоксилату синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука I).

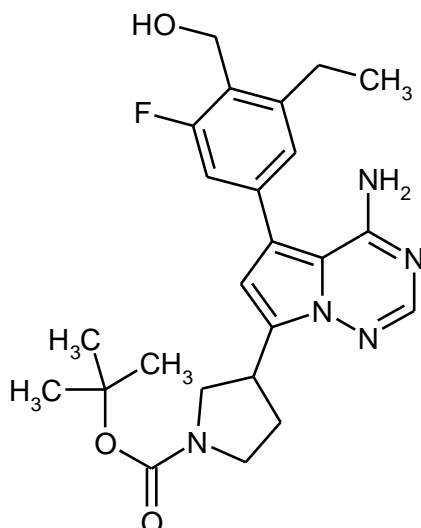
Трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)піролідин-1-карбоксилат (120 мг, 0,31 ммоль) розчиняли у ацетонітрилі (2,2 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргеном. Проміжна сполука 57A (100 мг, 0,38 ммоль), додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (36 мг, 0,03 ммоль) and 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,5 мл), та суміш нагрівали до 150 °C протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок очищали флеш-хроматографією (Biotage 25M кварцовий картридж, дихлорметан + 2-5 % метанол, швидкість потоку 10 мл/хв.) з одержанням 91 мг (54 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=2,00$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 442 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 440 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,41 (м, 9H), 2,00-2,48 (м, 2H), 3,29-3,53 (м, 3H), 3,71-3,90 (м, 2H), 4,55 (м, 2H), 4,99 (т, 1H), 6,63 (с, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,12 (с, 1H), 7,92 (с, 1H).

Проміжна сполука 66A

Рац-трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3-етил-5-фтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}піролідин-1-карбоксилат



Вихідний матеріал трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл)піролідін-1-карбоксилату синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука I).

- 5 Трет-бутил 3-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл)піролідін-1-карбоксилат (111 мг, 0,29 ммоль), Проміжну сполуку 58A (98 мг, 0,35 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (17 мг, 0,015 ммоль) розчиняли у суміші ацетонітрилу (2,3 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (0,53 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Після дегазування протягом 5 хв., використовуючи аргон, реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 10 150 °C протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження до кімнатної температури, додавали насичений водний розчин бікарбонату натрію, та суміш екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари висушували над сульфатом натрію, фільтрували та концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 5). Вихід: 83 мг (63 % теор.).

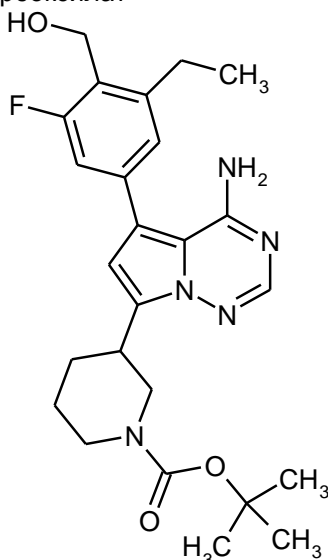
ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=1,61$  хв.;

- 15 РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=1,02$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 456,4 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 454,4 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,22 (т, 3H), 1,41 (с, 9H), 2,1 (м, 1H), 2,80 (к, 2H), 3,30-3,43 (м, 2H), 3,44-3,51 (м, 1H), 3,78 (м, 1H), 4,55 (д, 2H), 5,00 (т, 1H), 6,68 (с, 1H), 7,09 (д, 1H), 7,15 (с, 1H), 7,95 (с, 1H).

- 20 Проміжна сполука 67A

Рац-трет-бутил 3-{4-аміно-5-[3-етил-5-фтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-1-карбоксилат



- 25 Проміжну сполуку 31A (148 мг, 0,29 ммоль), Проміжну сполуку 58A (98 мг, 0,35 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (17 мг, 0,015 ммоль) розчиняли у суміші ацетонітрилу (2,3 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (0,67 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової

підки. Після дегазування протягом 5 хв. використовуючи аргон, реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 150 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження до кімнатної температури, додавали насичений водний розчин бікарбонату натрію, та суміш екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари висушували над сульфатом натрію, фільтрували та концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 5). Вихід: 105 мг (76 % теор.).

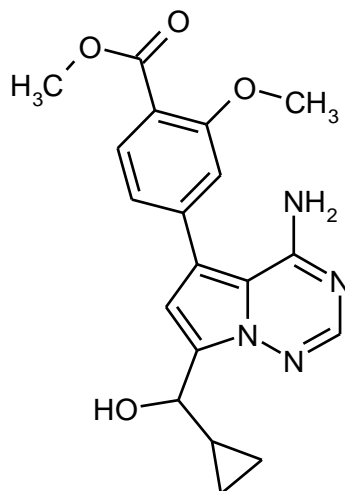
ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=1,71$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=1,08$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 470,4 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 468,4 (75)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,22 (т, 3H), 1,38 (с, 9H), 1,50 (м, 1H), 1,65-1,90 (м, 2H), 2,06 (м, 1H), 2,80 (к, 2H), 2,98 (м, 1H), 3,20-3,43 (м, 2H), 3,8 (м, 1H), 4,08 (м, 1H), 4,55 (д, 2H), 5,02 (т, 1H), 6,65 (с, 1H), 7,07 (д, 1H), 7,13 (с, 1H), 7,93 (с, 1H).

Проміжна сполука 68A

Рац-метил 4-{4-аміно-7-[циклопропіл(гідрокси)метил]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]-2-метоксибензоат



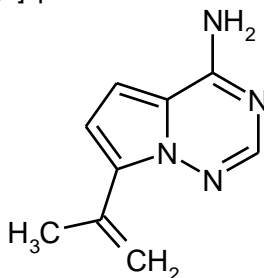
Проміжну сполуку 17A (250 мг, 0,88 ммоль), [3-метокси-4-(метоксикарбоніл)феніл]боронову кислоту (223 мг, 1,06 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (102 мг, 0,088 ммоль) розчиняли у суміші 1,4-діоксану (5,5 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,32 мл) в аргоні та кип'ятили із зворотнім холодильником протягом 16 год. Після цього, додавали іншу порцію тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (102 мг, 0,088 ммоль), та нагрівання продовжували протягом ще 24 год. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш фільтрували, фільтрат концентрували, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 7). Вихід: 130 мг (80 % чистота, 32 % теор.).

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,80$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 369,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 367,3 (75)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,41 (м, 3H), 0,49 (м, 1H), 1,37 (м, 1H), 3,81 (с, 3H), 4,68 (д, 1H), 6,92 (с, 1H), 7,13 (дд, 1H), 7,22 (д, 1H), 7,77 (д, 1H), 8,05 (с, 1H).

Проміжна сполука 69A

7-(Проп-1-ен-2-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



Вихідний матеріал 7-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-аміну синтезували за процедурою, описаною у WO 2007/056170-A2 (Проміжна сполука B).

В атмосфері аргону, 7-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін (426 мг, 2 ммоль) та 4,4,5,5-тетраметил-2-(проп-1-ен-2-іл)-1,3,2-діоксаборолан (420 мг, 2,5 ммоль) розчиняли у суміші 1,2-диметоксиетану (10 мл) та водного розчину карбонату натрію (2 М, 4 мл). Реакційну суміш

дегазували, та додавали 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероценпаладію(II) хлорид (73 мг, 0,1 ммоль). Після перемішування при 90 °С протягом ночі, реакційну суміш розводили етилацетатом (40 мл), додавали воду (10 мл), та шари розділяли. Водний шар екстрагували етилацетатом (2 × 40 мл), та об'єднані органічні шари висушували над сульфатом натрію, фільтрували та концентрували. Залишок очищали флеш-хроматографією (puriFlash, Interchim, градієнт циклогексан/етилацетат 1:1 до 100 % етилацетат) з одержанням вказаного у заголовку продукту у вигляді світло-жовтої твердої речовини. Вихід: 304 мг (81 % теор.).

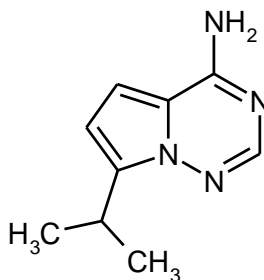
ВЕРХ (спосіб 10):  $R_f=0,83$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,57$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 175,1 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,15 (с, 3H), 5,22 (м, 1H), 6,30 (м, 1H), 6,73 (д, 1H), 6,91 (д, 1H), 7,69 (м, 1H), 7,91 (с, 1H).

Проміжна сполука 70A

7-Ізопропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



Проміжну сполуку 69A (149 мг, 0,86 ммоль) розчиняли у суміші етанолу та етилацетату (1:1, 40 мл) в атмосфері аргону. Додавали паладій на вуглеці (10 %, 9,1 мг), та суміш ретельно перемішували протягом 16 год. в атмосфері водню при тиску зовнішнього середовища та кімнатній температурі. Після цього, каталізатор видаляли фільтруванням, та розчинник відганяли при пониженому тиску з одержанням 131 мг (80 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді безбарвної твердої речовини. Цей продукт використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

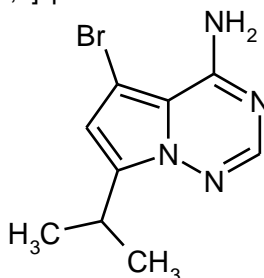
ВЕРХ (спосіб 10):  $R_f=0,81$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,56$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 177,0 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,27 (д, 6H), 3,36 (м, 1H), 6,41 (д, 1H), 6,80 (д, 1H), 7,48-7,59 (м, 2H), 7,80 (с, 1H).

Проміжна сполука 71A

5-Бром-7-ізопропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амін



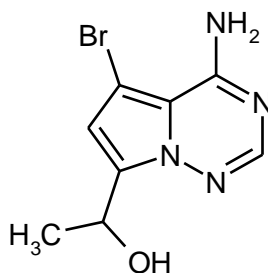
Проміжну сполуку 70A (125 мг, 0,71 ммоль) розчиняли у сухому ТГФ (21 мл) та охолоджували до -78 °С. 1,3-Дибром-5,5-диметилгідантоїн (81 мг, 0,28 ммоль) додавали двома рівними частинами. Реакційну суміш перемішували при -78 °С протягом години та потім нагрівали до кімнатної температури протягом ночі. Після додавання води (20 мл) та подальшого перемішування протягом 20 хв., осаджену тверду речовину збирали фільтруванням та висушували in vacuo. Неочищений продукт одержаний таким чином (209 мг, >100 % теор.) використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=1,35$  min.

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,91$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 257,0 (100)  $[M+H]^+$ .

Проміжна сполука 72A

Рац-1-(4-аміно-5-бромпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл)етанол



Проміжну сполуку 16A (500 мг, 1,66 ммоль) суспендували у ТГФ (10 мл) та охолоджували до 0 °С. Додавали розчин метил магній бромід (3 N у діетиловому етері, 1,7 мл), та реакційну суміш перемішували протягом 30 хв. Потім, додавали насичений водний розчин амонію хлорид, та суміш екстрагували етилацетатом (2 × 20 мл). Об'єднані органічні шари висушували над сульфатом магнію, фільтрували та концентрували з одержанням 235 мг (46 % теор.) вказаного у заголовку продукту, який використовували на наступній стадії синтезу без подальшої очистки.

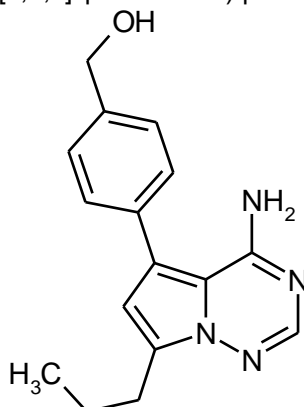
РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=0,73$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 259,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 257,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,41 (д, 3H), 5,16 (м, 1H), 5,30 (м, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,85 (с, 1H).

Приклади одержання:

Приклад 1

[4-(4-Аміно-7-пропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл)феніл]метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 11A (100 мг, 0,39 ммоль) та 4-(гідроксиметил)фенілборонової кислоти (60 мг, 0,39 ммоль). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 33 мг (30 % теор.).

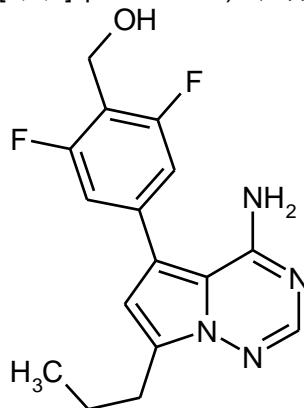
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,47$  хв.; ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,78$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,91$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 283,2 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,97 (т,  $J=7,4$  Гц, 3H), 1,71 (м, 2H), 3,31 (с, 2H), 4,52 (с, 2H), 6,54 (с, 1H), 7,42 (с, 4H), 7,89 (с, 1H).

Приклад 2

[4-(4-Аміно-7-пропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл)-2,6-дифторфеніл]метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 2 з Проміжної

сполуки 11A (118 мг, 0,46 ммоль) та (4-бром-2,6-дифторфеніл)метанолу (108 мг, 0,49 ммоль). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 59 мг (40 % теор.).

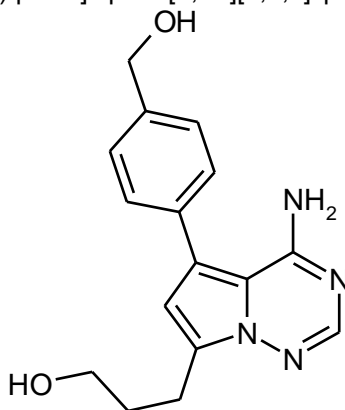
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,94$  хв.;

5 РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,47$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 319,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 317,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,95 (т, 3H), 1,71 (м, 2H), 4,52 (м, 2H), 5,26 (т, 1H), 6,64 (с, 1H), 7,10 (м, 2H), 7,91 (с, 1H).

Приклад 3

10 3-{4-Аміно-5-[4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}пропан-1-ол



Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 10A (100 мг, 0,37 ммоль) та 4-(гідроксиметил)фенілборонової кислоти (67 мг, 0,44 ммоль, 1,2 екв.) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 73 мг (66 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді безбарвної твердої речовини.

15

ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=2,91$  хв.; ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,14$  хв.;

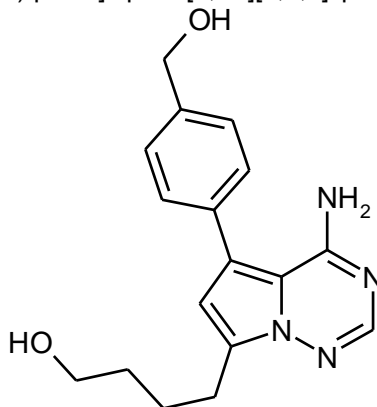
РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,60$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 299,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 297,4 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,84 (м, 2H), 2,95 (т,  $J=7,6$  Гц, 2H), 3,50 (м, 2H), 4,58 (с, 2H), 6,67 (с, 1H), 7,41 (с, 4H), 8,03 (с, 1H).

20

Приклад 4

4-{4-Аміно-5-[4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}бутан-1-ол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 14A (75 мг, 0,26 ммоль) та 4-(гідроксиметил)фенілборонової кислоти (48 мг, 0,32 ммоль). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 66 мг (80 % теор.).

25

ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,28$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,68$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 313,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 311,2 (100)  $[M-H]^-$ .

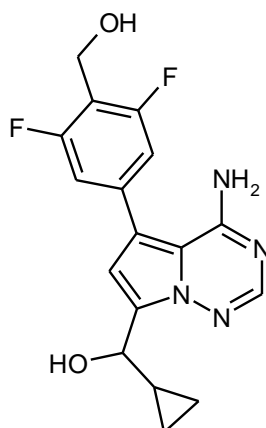
30

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,48-1,51 (м, 2H), 1,67-1,70 (м, 2H), 2,91 (т,  $J=7,6$  Гц, 2H), 3,42 (т,  $J=6,4$  Гц, 2H), 4,58 (с, 2H), 6,67 (с, 1H), 7,42 (с, 4H), 8,03 (с, 1H).

Приклад 5

{4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}(циклопропіл)метанол

35



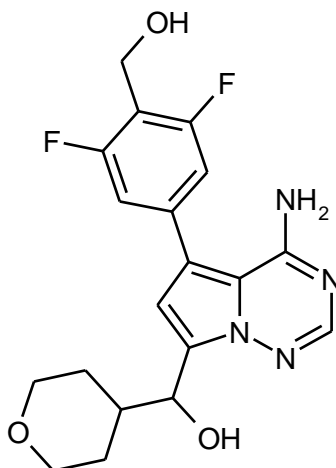
Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 17A (125 мг, 0,44 ммоль) та Проміжної сполуки 2A (114 мг, 0,53 ммоль) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 73 мг (48 % теор.).

5     РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,09$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 347,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 345,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,39 (м, 3H), 0,48 (м, 1H), 1,35 (м, 1H), 4,54 (д, 2H), 4,67 (м, 1H), 5,26 (м, 2H), 6,80 (с, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,92 (с, 1H).

Приклад 6

10     {4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}(тетрагідро-2H-піран-4-іл)метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 18A (200 мг, 0,61 ммоль) та Проміжної сполуки 2A (158 мг, 0,73 ммоль) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 125 мг (52 % теор.).

15     РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,29$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 391,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 389,0 (100)  $[M-H]^-$ .

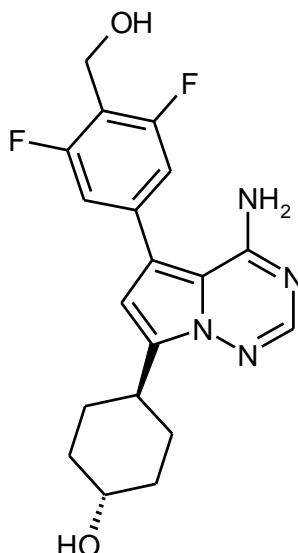
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,24 (ш. д, 1H), 1,36 (м, 2H), 1,68 (ш. д, 1H), 2,03 (м, 1H), 2,60 (т, 2H), 3,82 (м, 2H), 4,54 (с, 2H), 4,95 (ш. д, 1H), 5,28 (ш, 1H), 5,33 (ш, 1H), 6,73 (с, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,93 (с, 1H).

20     7,14 (м, 2H), 7,93 (с, 1H).

Приклад 7

Транс-4-{4-аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}циклогексанол





Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 24A (323 мг, 85 % чистота, 0,88 ммоль) та Проміжної сполуки 1A (286 мг, 1,06 ммоль, 1,2 екв.). Очистку неочищеного продукту спочатку здійснювали флеш-хроматографією (Biotage картридж, заповнений кварцом, елюент дихлорметан/метанол 95:5). Подальшу очистку здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 72 мг (21 % теор.).

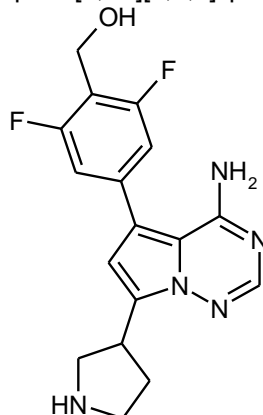
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,37$  хв.;

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=1,01$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 375,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 373,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,32 (м, 2H), 1,50 (м, 2H), 1,98 (м, 2H), 2,04 (м, 2H), 3,04 (тт, 1H), 3,47 (м, 1H), 4,51 (м, 2H), 4,61 (д, 1H), 5,26 (т, 1H), 6,60 (с, 1H), 7,12 (м, 2H), 7,91 (с, 1H).

Приклад 8

Рац-{4-[4-Аміно-7-(піролідин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол



Проміжну сполуку 51A (67 мг, 0,15 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (6 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 20 хв., потім всі летючі речовини видаляли при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 21 мг (41 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

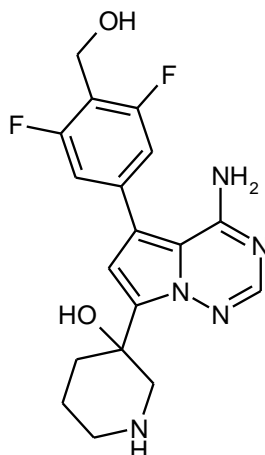
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,96$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,34$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 346,1 (20)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 344,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,94 (м, 1H), 2,22 (м, 1H), 2,94 (м, 1H), 3,00-3,16 (м, 2H), 3,40 (м, 2H), 3,72 (м, 1H), 4,51 (с, 2H), 5,22 (ш. с, 1H), 6,71 (с, 1H), 7,11 (м, 2H), 7,92 (с, 1H).

Приклад 9

Рац-3-{4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}піперидин-3-ол



Проміжну сполуку 52A (46 мг, 0,10 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (1,5 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 30 хв., потім всі летючі речовини видаляли при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 20 мг (55 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

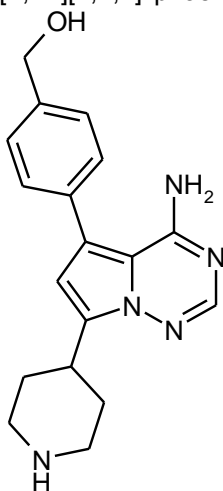
ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,94$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=1,01$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 358,1 (100)  $[M-H_2O+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 374,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,48 (м, 1H), 1,89 (м, 2H), 2,40-2,69 (м, 2H), 2,92 (д, 1H), 3,02 (д, 1H), 3,40 (м, 1H), 4,52 (м, 2H), 5,26 (т, 1H), 5,45 (с, 1H), 6,72 (с, 1H), 7,13 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

Приклад 10

{4-[4-Аміно-7-(піперидин-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Проміжну сполуку 53A (324 мг, 0,77 ммоль) розчиняли у дихлорметані (15 мл). Додавали трифтороцтову кислоту (1,5 мл), та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год. Додавали іншу частину трифтороцтової кислоти (1,5 мл), та перемішування продовжували доки ВЕРХ (спосіб 1) починало вказувати на повне перетворення вихідного матеріалу. Всі летючі речовини потім видаляли при пониженому тиску, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 1) з одержанням 226 мг (91 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

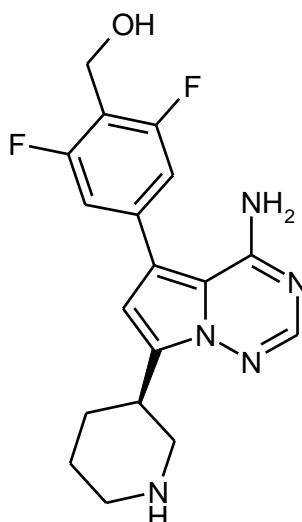
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,37$  хв.; ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=2,90$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,90$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 324,1 (75)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 322,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,79-1,95 (м, 2H), 2,16-2,23 (м, 2H), 3,05-3,19 (м, 2H), 3,37-3,52 (м, 3H), 4,56 (с, 2H), 5,49 (с, 2H), 6,66 (с, 1H), 7,43 (с, 4H), 8,03 (с, 1H), 8,39-8,50 (м, 1H), 8,65-8,69 (м, 1H).

Приклад 11

(4-{4-Аміно-7-[(3R)-піперидин-3-іл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл}-2,6-дифторфеніл)метанол



Проміжну сполуку 55A (35 мг, 0,08 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (1,5 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 30 хв., потім всі летючі речовини видаляли при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 18 мг (66 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,10$  хв.;

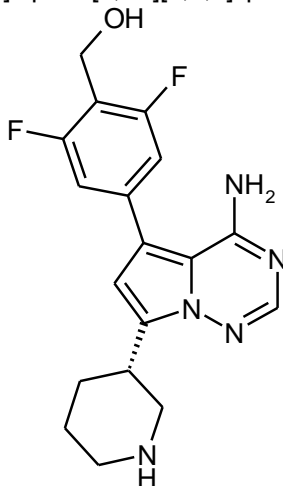
РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,55$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 360,2 (20)  $[M+H]^+$ , МС (ESIneg):  $m/z$  (%) = 358,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,67 (м, 2H), 1,83 (м, 1H), 2,75 (м, 1H), 2,86 (м, 1H), 3,20 (д, 1H), 3,41 (м, 2H), 4,53 (м, 2H), 5,29 (т, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,11 (м, 1H), 7,94 (с, 1H).

$[\alpha]_{589}^{20} = +16,8^\circ$  ( $c=0,515$ , метанол).

Приклад 12

(4-{4-Аміно-7-[(3S)-піперидин-3-іл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл}-2,6-дифторфеніл)метанол

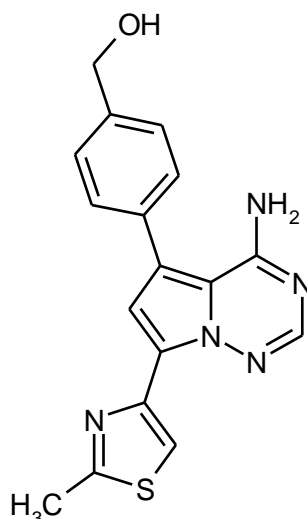


Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 56A (19 мг, 0,04 ммоль) за таким же способом, що описаний для перетворення проміжної сполуки 55A у Прикладі 11. Вихід: 12 мг (81 % теор.).

Дані ВЕРХ, РХ-МС та  $^1\text{H}$ -ЯМР були ідентичними з тими, які наведені для Прикладу 11.

Приклад 13

{4-[4-Аміно-7-(2-метил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Проміжну сполуку 33A (60 мг, 0,21 ммоль) та тіоацеамід (15 мг, 0,20 ммоль, 0,95 екв.) розчиняли у 1,4-діоксані (2 мл) та кип'ятили із зворотнім холодильником протягом 4,5 год. Після охолодження, додавали 4-(гідроксиметил)фенілборонову кислоту (38 мг, 0,25 ммоль, 1,2 екв.),  
 5 тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (59 мг, 0,07 ммоль, 0,25 екв.) та 2 М водний розчин карбонату натрію (0,4 мл). Суміш обережно перемішували при 100 °С протягом 16 год. Потім, іншу порцію тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (24 мг, 0,1 екв.) додавали, та перемішування при 100 °С продовжували протягом ще 4 год. Реакційну суміш потім фільтрували, фільтрат випаровували при пониженому тиску, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з  
 10 одержанням 28 мг (40 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді жовтуватих кристалів.

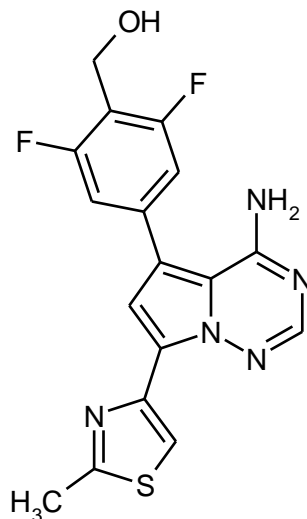
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,85$  хв.; ВЕРХ (спосіб 2):  $R_t=3,60$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,94$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 338,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 336,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,73 (с, 3H), 4,58 (с, 2H), 7,17 (с, 1H), 7,45 (д,  $J=8,3$  Гц, 2H), 7,50 (д,  $J=8,3$  Гц, 2H), 8,09 (с, 1H), 8,33 (с, 1H).

Приклад 14

{4-[4-Аміно-7-(2-метил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1- $f$ ][1,2,4]тріазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 34A (75 мг, 0,24 ммоль) та Проміжної сполуки 1A (78 мг, 0,29 ммоль, 1,2 екв.). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 27 мг (30 % теор.).

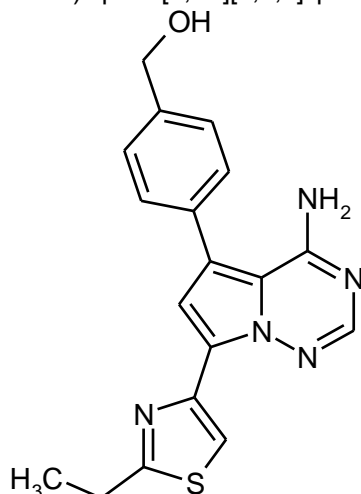
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,79$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,03$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 374,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 372,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,72 (с, 3H), 4,53 (с, 2H), 7,18-7,27 (м, 2H), 8,11 (с, 1H), 8,33 (с, 1H).

Приклад 15

{4-[4-Аміно-7-(2-етил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Проміжна сполука 35A (91 мг, 0,28 ммоль) реагувала з 4-(гідроксиметил)фенілбороновою кислотою (51 мг, 0,34 ммоль, 1,2 екв.) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 68 мг (69 % теор.) вказаної у заголовку сполуки у вигляді безбарвних кристалів.

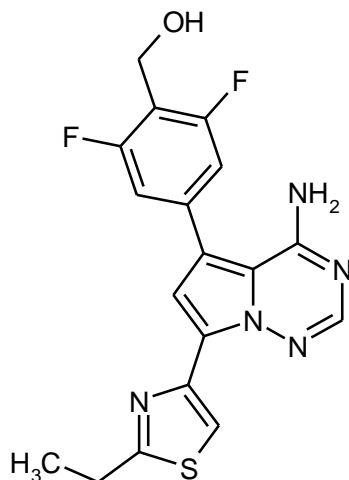
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,73$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,05$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 352,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 350,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,36 (т,  $J=7,6$  Гц, 3H), 3,06 (к,  $J=7,6$  Гц, 2H), 4,58 (с, 2H), 7,19 (с, 1H), 7,46 (д,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,52 (д,  $J=8,0$  Гц, 2H), 8,12 (с, 1H), 8,36 (с, 1H).

Приклад 16

{4-[4-Аміно-7-(2-етил-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 35A (34 мг, 0,11 ммоль) та Проміжної сполуки 1A (34 мг, 0,13 ммоль, 1,2 екв.). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 16 мг (40 % теор.).

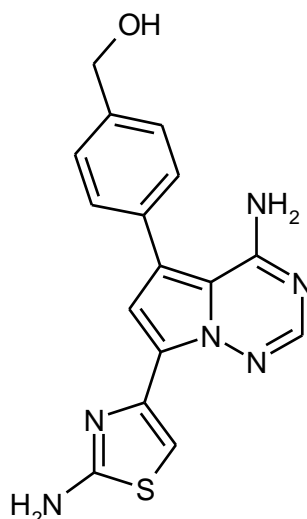
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=4,04$  хв.;

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=1,15$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 388,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 386,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,38 (т, 3H), 3,06 (к, 2H), 4,55 (с, 2H), 7,20-7,31 (м, 3H), 8,16 (с, 1H), 8,38 (с, 1H).

Приклад 17

{4-[4-Аміно-7-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували за загальним способом синтезу 1 з Проміжної сполуки 36A (55 мг, 0,18 ммоль) та 4-(гідроксиметил)фенілборонової кислоти (32 мг, 0,21 ммоль). Очистку неочищеного продукту здійснювали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Вихід: 29 мг (49 % теор.).

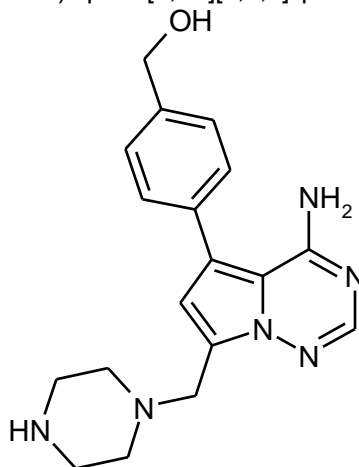
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,03$  хв.;

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,21$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 339,1 (30)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 337,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 4,58 (м, 2H), 5,75 (м, 1H), 6,93 (с, 1H), 7,05 (м, 2H), 7,43 (м, 4H), 7,55 (с, 1H), 8,08 (с, 1H).

Приклад 18

{4-[4-Аміно-7-(піперазин-1-ілметил)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Проміжну сполуку 37A (200 мг, 0,49 ммоль), 4-(гідроксиметил)фенілборонову кислоту (90 мг, 0,59 ммоль, 1,2 екв.) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (57 мг, 0,05 ммоль, 0,1 екв.) розчиняли у суміші 1,4-діоксану (4,0 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували крізь шар Celite, який промивали 1,4-діоксаном для вимивання всіх органічних речовин. Об'єднаний фільтрат випаровували до сухого залишку при пониженому тиску, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 1) з одержанням 75 мг (45 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

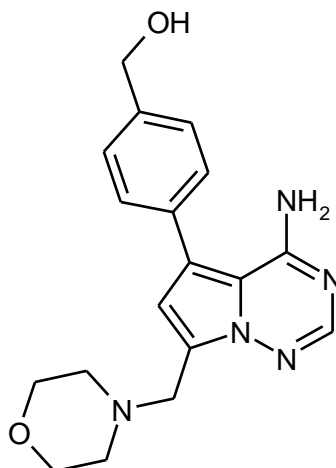
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=2,85$  хв.;

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,93$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 339,1 (30)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 337,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,38 (ш. с, 4H), 2,63 (м, 4H), 3,80 (с, 2H), 4,55 (с, 2H), 5,26 (ш. с, 1H), 6,60 (с, 1H), 7,39 (с, 4H), 7,90 (с, 1H).

Приклад 19

{4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]феніл}метанол



Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 38А (200 мг, 0,64 ммоль) та 4-(гідроксиметил)фенілборонової кислоти (116 мг, 0,77 ммоль, 1,2 екв.) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Матеріал одержаний

5 таким чином розчиняли у кількох мл суміші ацетонітрилу та води, додавали 2 М водний розчин карбонату натрію, та суміш перемішували протягом 10 хв. Протягом цього часу, вказану у заголовку сполуку осаджували. Кристали відділяли фільтруванням та висушували у вакуумі з одержанням 95 мг (49 % теор.) безбарвної твердої речовини.

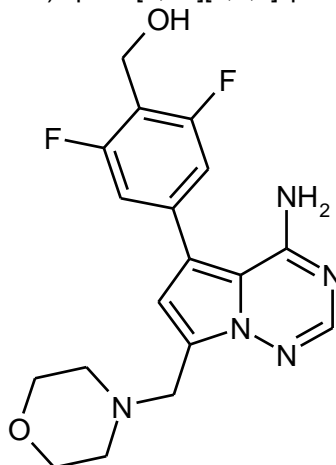
ВЕРХ (спосіб 1):  $R_t=3,21$  хв.;

10 РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=0,93$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 340 (1)  $[M+H]^+$ , МС (ЕСIneg):  $m/z$  (%) = 338,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,47 (м, 4Н), 3,31 (с, 4Н), 3,53 (т, 2Н), 3,82 (с, 1Н), 4,56 (д, 2Н), 5,22 (т, 1Н), 6,63 (с, 1Н), 7,42 (с, 4Н), 7,90 (с, 1Н).

Приклад 20

15 {4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол



До розчину проміжної сполуки 40А (110 мг, 0,22 ммоль) у ТГФ (2,2 мл) додавали 0,45 мл (0,45 ммоль) 1 М розчин тетрабутиламонію фториду (ТБАФ) у THF, та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом години. Реакційну суміш потім випаровували при пониженому тиску, та залишок суспендували у 3 мл метанолу та перемішували при кімнатній температурі

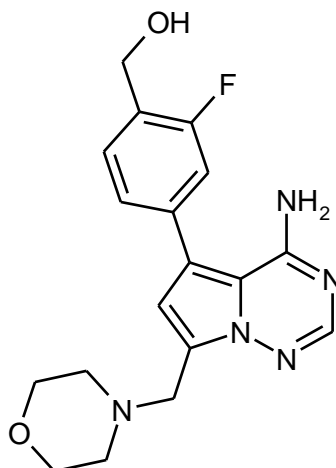
20 протягом 5 хв. Одержаний осад фільтрували, промивали невеликою кількістю метанолу та висушували у вакуумі з одержанням 68 мг (81 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=1,03$  хв.; МС (ЕСIpos):  $m/z$  (%) = 376,0 (80)  $[M+H]^+$ , МС (ЕСIneg):  $m/z$  (%) = 374,1 (100)  $[M-H]^-$ .

25  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,45 (ш. м, 4Н), 3,56 (т, 4Н), 3,82 (с, 2Н), 4,54 (д, 2Н), 5,27 (т, 1Н), 6,75 (с, 1Н), 7,16 (м, 2Н), 7,95 (с, 1Н).

Приклад 21

{4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-фторфеніл}метанол



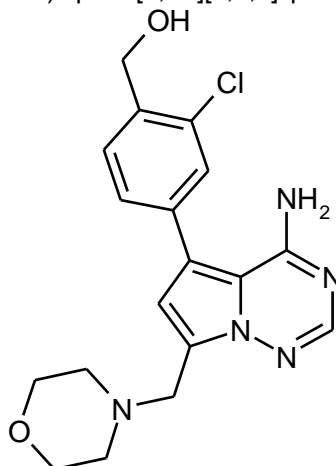
До суспензії проміжної сполуки 41A (65,0 мг, 0,17 ммоль) у ТГФ (2,0 мл) додавали 0,2 мл (0,2 ммоль) 1 М розчину літій алюміній гідриду у THF, та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом години. Отриманий розчин гасили водою та потім безпосередньо очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3) з одержанням 35 мг (58 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,98$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 358,1 (20)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 356,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,46 (ш. м, 4H), 3,56 (т, 4H), 3,83 (с, 2H), 4,60 (д, 2H), 5,32 (т, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,27 (дд, 2H), 7,55 (т, 1H), 7,94 (с, 1H).

Приклад 22

{4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-хлорфеніл}метанол



Проміжну сполуку 39A (200 мг, 0,56 ммоль), Проміжну сполуку 3A (112 мг, 0,51 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (58 мг, 0,05 ммоль) розчиняли у суміші 1,4-діоксану (4,0 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °C протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3) з одержанням 48 мг (23 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

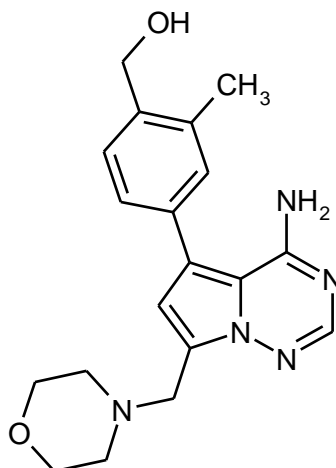
РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,53$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 374,1 (80)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 372,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,46 (ш. м, 4H), 3,56 (т, 4H), 3,83 (с, 2H), 4,61 (д, 2H), 5,45 (т, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,44 (дд, 1H), 7,49 (д, 1H), 7,63 (т, 1H), 7,94 (с, 1H).

Приклад 23

{4-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-метилфеніл}метанол





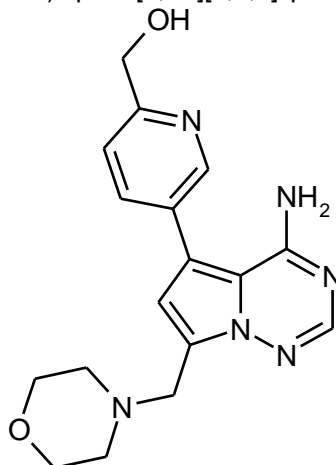
По аналогії з одержанням Прикладу 28, Проміжна сполука 39А (200 мг, 0,56 ммоль) реагувала з Проміжною сполукою 4А (102 мг, 0,51 ммоль) з одержанням 9 мг (5 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

5      РХ-МС (спосіб 4):  $R_f=1,00$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 354,3 (10)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 372,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,30 (с, 3H), 2,45 (ш. м, 4H), 3,56 (т, 4H), 3,83 (с, 2H), 4,54 (д, 2H), 5,13 (т, 1H), 6,63 (с, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,26 (д, 1H), 7,45 (д, 1H), 7,91 (с, 1H).

Приклад 24

10      {5-[4-Аміно-7-(морфолін-4-ілметил)піроло[2,1- $f$ ][1,2,4]триазин-5-іл]піридин-2-іл}метанол



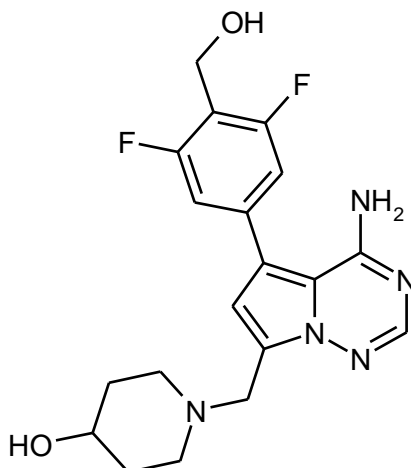
Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 38А (200 мг, 0,64 ммоль) та Проміжної сполуки 6А (147 мг, 0,96 ммоль) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 4). Залишки домішок видаляли суспендуванням продукту у ацетонітрилі (2 мл) та збиранням залишку твердої речовини фільтруванням. Вихід: 27 мг (12 % теор.).

15      РХ-МС (спосіб 4):  $R_f=0,78$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 341 (10)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 339,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 2,46 (ш. м, 4H), 3,56 (т, 4H), 3,84 (с, 2H), 4,62 (д, 2H), 5,46 (т, 1H), 6,73 (с, 1H), 7,54 (д, 1H), 7,86 (дд, 1H), 7,95 (д, 1H), 8,56 (с, 1H).

Приклад 25

20      1-({4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1- $f$ ][1,2,4]триазин-7-іл}метил)піперидин-4-ол



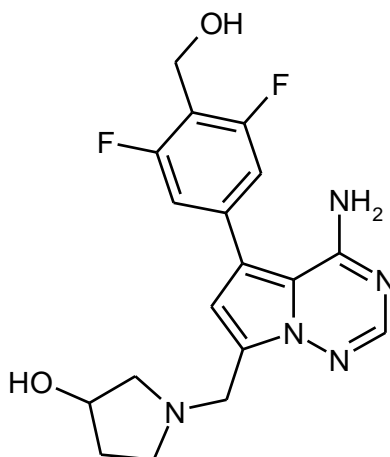
Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 45A (200 мг, 0,61 ммоль) та Проміжної сполуки 2A (159 мг, 0,74 ммоль) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 103 мг (43 % теор.).

5     РХ-МС (спосіб 4):  $R_f=0,98$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 390,1 (60)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 388,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,36 (ш. м, 2H), 1,68 (ш. м, 2H), 2,12 (ш. м, 2H), 2,75 (ш. м, 2H), 3,41 (ш. м, 1H), 3,79 (с, 2H), 4,51 (д, 1H), 4,54 (д, 2H), 5,27 (т, 1H), 6,72 (с, 1H), 7,15 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

10     Приклад 26

1-({4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}метил)піролідін-3-ол



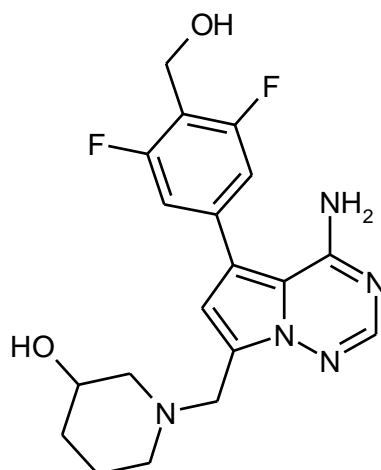
15     Зазначену у заголовку сполуку одержували з Проміжної сполуки 47A (110 мг, 0,35 ммоль) та Проміжної сполуки 2A (91,3 мг, 0,42 ммоль) за загальним способом синтезу 1. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3). Вихід: 69 мг (52 % теор.).

РХ-МС (спосіб 4):  $R_f=0,25$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 376,1 (20)  $[M+H]^+$ .

20      $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,54 (м, 1H), 1,98 (м, 1H), 2,43 (ш. д, 1H), 2,69 (м, 1H), 2,79 (дд, 1H), 3,93 (дд, 2H), 4,18 (ш, 1H), 4,53 (д, 2H), 4,69 (д, 1H), 5,27 (т, 1H), 6,75 (с, 1H), 7,16 (м, 2H), 7,95 (с, 1H).

Приклад 27

1-({4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}метил)піперидин-3-ол



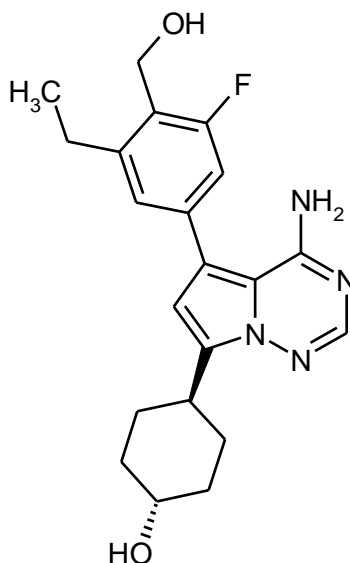
До розчину проміжної сполуки 50A (150 мг, 0,30 ммоль) у ТГФ (3,0 мл) додавали 0,60 мл (0,60 ммоль) 1 М розчин тетрабутиламонію фториду (ТБАФ) у THF, та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом години. Реакційну суміш потім концентрували, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 3) з одержанням 65 мг (56 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 7):  $R_t=0,33$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 390,3 (100)  $[M+H]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,02 (ш. м, 1H), 1,40 (ш. м, 1H), 1,60 (ш. м, 1H), 1,77 (ш. м, 2H), 1,95 (ш. м, 1H), 2,73 (ш. м, 1H), 2,88 (ш. м, 1H), 3,43 (ш. м, 1H), 3,83 (ш. м, 2H), 4,54 (ш. д, 3H), 5,27 (т, 1H), 6,74 (с, 1H), 7,15 (м, 2H), 7,95 (с, 1H).

Приклад 28

Транс-4-{4-Аміно-5-[3-етил-5-фтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}циклогексанол



Проміжну сполуку 24A (120 мг, 0,39 ммоль) та Проміжну сполуку 58A (130 мг, 0,46 ммоль) розчиняли у ацетонітрилі (3,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргонном. Додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (22 мг, 0,02 ммоль) та 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,7 мл), та суміш нагрівали до 150 °C протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 36 мг (23 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

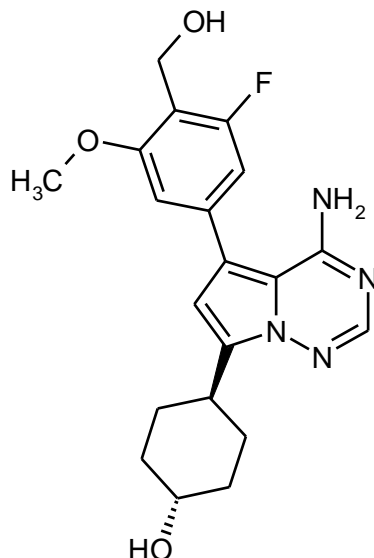
РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,82$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 385 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 383 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,24 (т, 3H), 1,28-1,38 (м, 2H), 1,46-1,54 (м, 2H), 1,94-1,97 (м, 2H), 2,01-2,05 (м, 2H), 2,82 (к, 2H), 3,03 (м, 1H), 3,47 (м, 1H), 4,53 (м, 2H), 4,61 (д, 1H), 5,02 (т, 1H), 6,58 (с, 1H), 7,08 (д, 1H), 7,15 (с, 1H), 7,90 (с, 1H).

Приклад 29

Транс-4-{4-Аміно-5-[3-фтор-4-(гідроксиметил)-5-метоксифеніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}циклогексанол

іл}циклогексанол



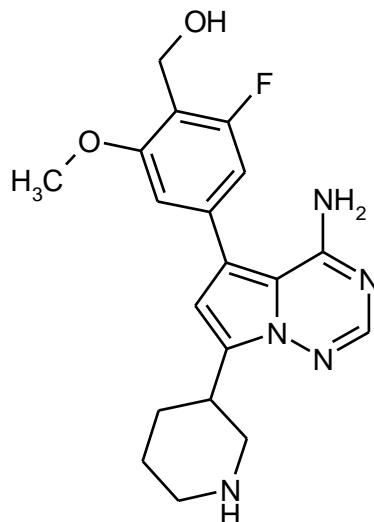
Проміжну сполуку 24A (120 мг, 0,39 ммоль) та Проміжну сполуку 59A (163 мг, 80 % чистота, 0,46 ммоль) розчиняли у ацетонітрилі (2,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргонном. Додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (45 мг, 0,04 ммоль) та 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,5 мл), та суміш нагрівали до 150 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат випаровували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 6 мг (4 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 5):  $R_t=1,36$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 387 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 385 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,24-1,33 (м, 2Н), 1,42-1,53 (м, 2Н), 1,90-1,93 (м, 2Н), 2,00-2,04 (м, 2Н), 3,04 (м, 1Н), 3,46 (м, 1Н), 3,82 (с, 3Н), 4,48 (м, 2Н), 4,60 (д, 1Н), 4,83 (т, 1Н), 6,60 (с, 1Н), 6,85 (д, 1Н), 6,90 (с, 1Н), 7,91 (с, 1Н).

Приклад 30

{4-[4-Аміно-7-(піперидин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-фтор-6-метоксифеніл}метанол



Проміжну сполуку 63A (50 мг, 0,11 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (5,0 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 30 хв., потім всі летючі речовини видаляли дистилюванням при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 30 мг (76 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

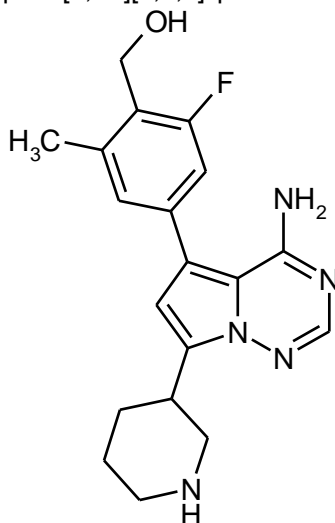
РХ-МС (спосіб 6):  $R_t=0,59$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 372 (10)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) =

370 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,50-2,08 (м, 4H), 2,94 (м, 2H), 3,17-3,30 (м, 3H), 3,85 (с, 3H), 4,51 (м, 2H), 4,82 (т, 1H), 6,60 (с, 1H), 6,84 (д, 1H), 6,89 (с, 1H), 7,90 (с, 1H).

Приклад 31

5 {4-[4-Аміно-7-(піперидин-3-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]-2-фтор-6-метилфеніл}метанол



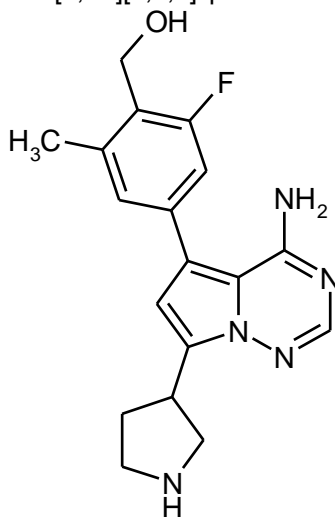
Проміжну сполуку 64A (110 мг, 0,21 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (5,0 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 30 хв., потім всі летючі речовини видаляли дистилюванням при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 59 мг (78 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

РХ-МС (спосіб 4): R<sub>t</sub>=1,10 хв.; МС (ЕСIpos): m/z (%) = 356 (40) [M+H]<sup>+</sup>, МС (ЕСIneg): m/z (%) = 354 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,44-2,08 (м, 4H), 2,42 (с, 3H), 2,94 (м, 2H), 3,17-3,27 (м, 3H), 4,53 (м, 2H), 4,98 (т, 1H), 6,54 (с, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,11 (с, 1H), 7,90 (с, 1H).

Приклад 32

{4-[4-Аміно-7-(піролідин-3-іл)піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл]-2-фтор-6-метилфеніл}метанол



Проміжну сполуку 65A (90 мг, 0,17 ммоль) розчиняли у 30 % розчині трифтороцтової кислоти у дихлорметані (5,0 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 30 хв., потім всі летючі речовини видаляли дистилюванням при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином розчиняли у етилацетаті та промивали насиченим водним розчином карбонату натрію. Органічний шар висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 27 мг (47 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

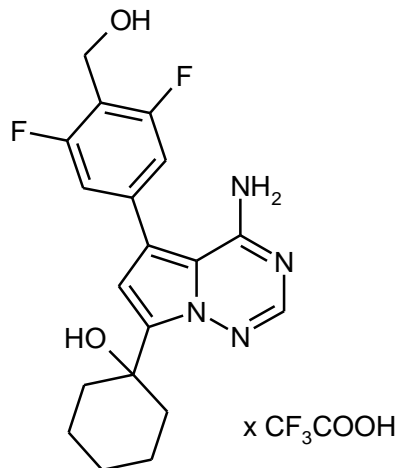
РХ-МС (спосіб 4): R<sub>t</sub>=1,03 хв.; МС (ЕСIpos): m/z (%) = 342 (100) [M+H]<sup>+</sup>, МС (ЕСIneg): m/z (%)

$$= 340 (100) [\text{M-H}]^-.$$

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,80-2,21 (м, 2H), 2,43 (с, 3H), 2,78-2,81 (м, 1H), 2,85-3,02 (м, 2H), 3,22-3,27 (м, 1H), 3,63 (м, 1H), 4,55 (ш. с, 2H), 4,98 (т, 1H), 6,63 (с, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,11 (с, 1H), 7,90 (с, 1H).

5      Приклад 33

1-{4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}циклогексанол трифторацетат



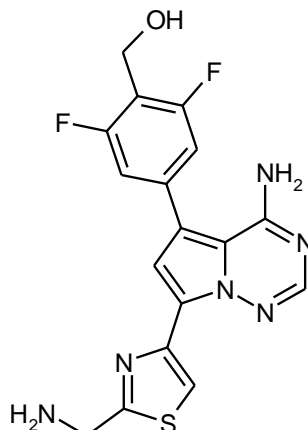
Проміжну сполуку 61A (95 мг, 0,31 ммоль) та Проміжну сполуку 1A (87 мг, 0,32 ммоль) розчиняли у ДМФ (2,0 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки та промивали аргонном. Додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (35 мг, 0,03 ммоль) та 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,5 мл), та суміш нагрівали до 150 °C протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження, суміш фільтрували, та фільтрат безпосередньо очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2) з одержанням 6 мг (4 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

PX-MC (спосіб 6):  $R_f=1,05$  хв.; MC (ECIpos):  $m/z$  (%) = 375 (100)  $[M+H]^+$ , MC (ECIneg):  $m/z$  (%) = 373 (100)  $[M-H]^-$ .

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (млн.ч.) = 1,20-1,33 (м, 1H), 1,42-1,51 (м, 2H), 1,60-1,82 (м, 5H), 2,17-2,28 (м, 2H), 4,51 (с, 2H), 6,76 (с, 1H), 7,17 (м, 2H), 8,02 (с, 1H).

20 Приклад 34

(4-{4-Аміно-7-[2-(амінометил)-1,3-тіазол-4-іл]піроло[2,1-ф][1,2,4]триазин-5-іл}-2,6-дифторфеніл)метанол



Проміжну сполуку 62A (67 мг, 0,16 ммоль), Проміжну сполуку 1A (51 мг, 0,19 ммоль), тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (18 мг, 0,02 ммоль) та 2,0 М водн. розчин карбонату натрію (0,94 мл) розчиняли у 1,4-діоксані (2,50 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °С протягом 3 год. у однофазній мікрохвильовій пічці. Потім, реакційну суміш фільтрували, та фільтрат розводили ацетонітрилом та обробляли діетиловим етером. Одержаний осад збирали та очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 2). Продукт одержаний таким чином (15 мг) потім обробляли 20 % розчином трифтороцтової кислоти у дихлорметані (2 мл) протягом 20 хв. Летючі речовини видаляли дистилюванням, та залишок обробляли конц. водний розчином карбонату натрію та

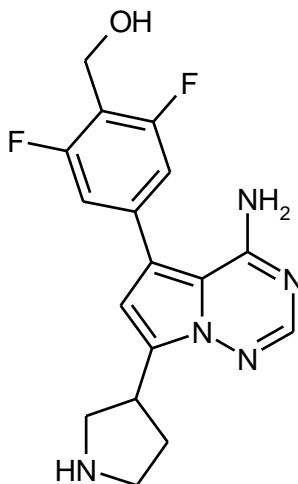
екстрагували етилацетатом. Органічний екстракт висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням вказаної у заголовку сполуки (10 мг, 13 % теор.) у вигляді безбарвної твердої речовини.

РХ-МС (спосіб 4):  $R_t=1,12$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 389 (25)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 387 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 4,24 (с, 2H), 4,53 (м, 2H), 5,30 (т, 1H), 7,18-7,23 (м, 3H), 8,11 (с, 1H), 8,40 (с, 1H).

Приклад 35

Ент-{4-[4-Аміно-7-(піролідин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол (енантіомер 1)



Зазначену у заголовку сполуку одержували розділенням рацемічної сполуки Прикладу 8 (54 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak AD-H, 250 мм × 20 мм; елюент: ізогексан/етанол 35:65; швидкість потоку: 20 мл/хв.; УФ виявлення: 220 нм]. Вихід: 12,5 мг.

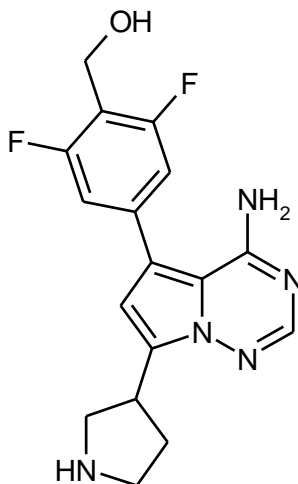
Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak AD-H, 5 мкм, 250 мм × 4,6 мм; елюент: ізогексан/етанол 50:50+0,2 % диетиламін; швидкість потоку: 1,0 мл/хв.; температура: 40 °C; УФ виявлення: 220 нм]:  $R_t=9,452$  хв., е.н. >99 %.

ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=0,70$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,42$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 346,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 344,0 (100)  $[M-H]^-$ .

Приклад 36

Ент-{4-[4-Аміно-7-(піролідин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2,6-дифторфеніл}метанол (енантіомер 2)



Зазначену у заголовку сполуку одержували розділенням рацемічної сполуки Прикладу 8 (54 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak AD-H, 250 мм × 20 мм; елюент: ізогексан/етанол 35:65; швидкість потоку: 20 мл/хв.; УФ виявлення: 220 нм]. Вихід: 14 мг.

Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak AD-H, 5 мкм, 250 мм × 4,6 мм; елюент:

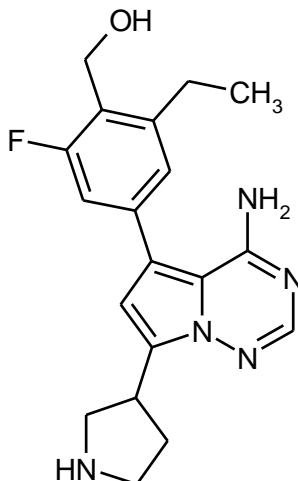
ізогексан/етанол 50:50+0,2 % диетиламін; швидкість потоку: 1,0 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 220 нм]:  $R_t=13,695$  хв., е.н. >99 %.

ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=0,71$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,42$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 346,1 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 344,0 (100)  $[M-H]^-$ .

Приклад 37

Рац-{4-[4-Аміно-7-(піролідин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-етил-6-фторфеніл}метанол



Проміжну сполуку 66A (72 мг, 0,158 ммоль) розчиняли у дихлорметані (3,8 мл) при 0 °С та додавали трифтороцтову кислоту (1,0 мл). Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 40 хв., потім всі летючі речовини видаляли при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 6). Об'єднаний продукт, що містив фракції, доводили до лужного значення рН, використовуючи насичений водний розчин карбонату натрію, та концентрували до сухого залишку. Отриманий залишок суспендували у етилацетаті (50 мл) та фільтрували. Органічний шар промивали сольовим розчином (5 мл), висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 31 мг (56 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

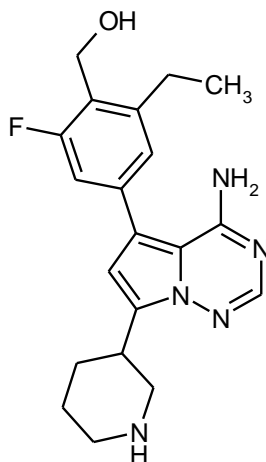
ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=0,81$  хв.;

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,55$  хв.; МС (ECIpos):  $m/z$  (%) = 356,3 (50)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 354,2 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,23 (т, 3H), 1,84-2,24 (м, 1H), 2,81 (к, 2H), 2,80-2,99 (м, 1H), 3,00-3,72 (м, 1H), 4,56 (д, 2H), 5,00 (т, 1H), 6,68 (с, 1H), 7,09 (д, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,92 (с, 1H).

Приклад 38

Рац-{4-[4-Аміно-7-(піперидин-3-іл)піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-5-іл]-2-етил-6-фторфеніл}метанол



Проміжну сполуку 67A (108 мг, 0,230 ммоль) розчиняли у дихлорметані (5,2 мл) при 0 °С та додавали трифтороцтову кислоту (1,4 мл). Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 40 хв., потім всі летючі речовини видаляли при пониженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 6). Об'єднаний продукт, що містив фракції, доводили до лужного



значення рН, використовуючи насичений водний розчин карбонату натрію та концентрували до сухого залишку. Отриманий залишок суспендували у етилацетаті (50 мл) та фільтрували. Органічний шар промивали сольовим розчином (5 мл), висушували над безводним сульфатом натрію, та розчинник відганяли з одержанням 83 мг (85 % теор.) вказаної у заголовку сполуки.

5 ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=0,81$  хв.;

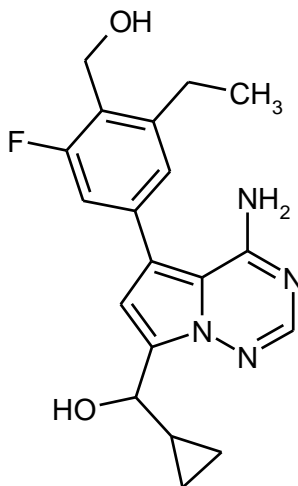
РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,58$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 370,3 (50)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 368,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 1,22 (т, 3H), 1,51-1,72 (м, 2H), 2,00-2,10 (м, 1H), 2,51-2,65 (м, 2H), 2,81 (к, 2H), 2,95-3,03 (м, 1H), 3,20-3,27 (м, 1H), 4,56 (д, 2H), 5,00 (т, 1H), 6,60 (с, 1H), 7,07 (д, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,91 (с, 1H).

10

Приклад 39

Рац-{4-аміно-5-[3-етил-5-фтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}(циклопропіл)метанол



15

Проміжну сполуку 17A (83 мг, 0,29 ммоль), Проміжну сполуку 58A (98 мг, 0,35 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (17 мг, 0,015 ммоль) розчиняли у суміші ацетонітрилу (2,3 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (0,53 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Після дегазування протягом 5 хв. використовуючи аргон, реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 150 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження до кімнатної температури, додавали насичений водний розчин бікарбонату натрію, та суміш тричі екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари висушували над сульфатом натрію, фільтрували та концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 5) з одержанням вказаної у заголовку сполуки. Вихід: 63 мг (61 % теор.).

20

25

ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=1,13$  хв.;

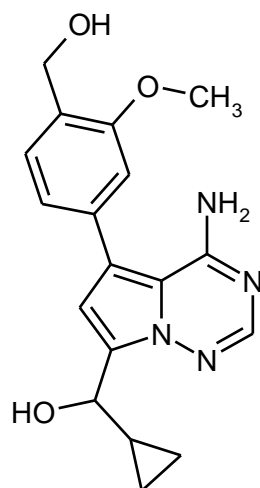
РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,78$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 357,3 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 355,3 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,39 (м, 3H), 0,48 (м, 1H), 1,23 (т, 3H), 1,35 (м, 1H), 2,81 (к, 2H), 4,56 (д, 2H), 4,68 (м, 1H), 5,01 (м, 1H), 5,21 (м, 1H), 6,76 (с, 1H), 7,09 (д, 1H), 7,14 (с, 1H), 7,90 (с, 1H).

30

Приклад 40

Рац-{4-аміно-5-[4-(гідроксиметил)-3-метоксифеніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}(циклопропіл)метанол

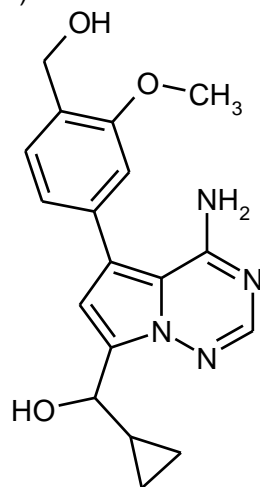


Проміжну сполуку 68A (130 мг, 0,353 ммоль) розчиняли у тетрагідрофурані (6,9 мл) та охолоджували до 0 °С. Розчин літій алюмінію гідриду (1 М у діетиловому етері, 0,78 мл) додавали краплями, та реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури протягом ночі. Реакційну суміш потім гасили водою та фільтрували. Фільтрат концентрували, та залишок очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 8) з одержанням вказаної у заголовку сполуки. Вихід: 63 мг (51 % теор.).

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,62$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 341,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 339,1 (100)  $[M-H]^-$ .

Приклад 41

Ент-4-аміно-5-[4-(гідроксиметил)-3-метоксифеніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}(циклопропіл)метанол (енантіомер 1)



Зазначену у заголовку сполуку одержували розділенням рацемічної сполуки Прикладу 40 (63 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak IC, 5 мкм, 250 мм × 20 мм; елюент: трет-бутил метиловий етер/метанол 85:15; швидкість потоку: 15 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 220 нм]. Вихід: 17 мг.

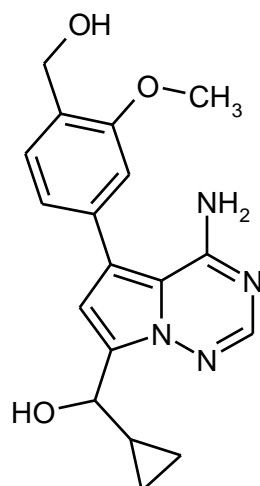
Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak IC, 5 мкм, 250 мм × 4,6 мм; елюент: трет-бутил метиловий етер/метанол 85:15; швидкість потоку: 1,0 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 220 нм]:  $R_t=4,76$  хв., е.н. >99 %.

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,67$  хв.; МС (EClpos):  $m/z$  (%) = 341,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (EClneg):  $m/z$  (%) = 339,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,40 (м, 3H), 0,48 (м, 1H), 1,36 (м, 1H), 3,83 (с, 3H), 4,54 (д, 2H), 4,68 (м, 1H), 5,07 (т, 1H), 5,25 (д, 1H), 6,74 (с, 1H), 7,00 (с, 1H), 7,03 (д, 1H), 7,47 (д, 1H), 7,89 (с, 1H).

Приклад 42

Ент-4-аміно-5-[4-(гідроксиметил)-3-метоксифеніл]піроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-іл}(циклопропіл)метанол (енантіомер 2)



Зазначену у заголовку сполуку одержували розділенням рацемічної сполуки Прикладу 40 (63 мг), використовуючи препаративну хіральну ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak IC, 5 мкм, 250 мм × 20 мм; елюент: трет-бутил метиловий етер/метанол 85:15; швидкість потоку: 15 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 220 нм]. Вихід: 25 мг.

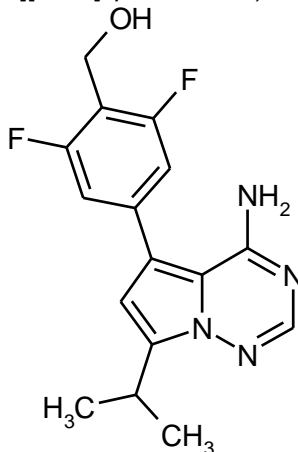
Аналітична хіральна ВЕРХ [колонка: Daicel Chiralpak IC, 5 мкм, 250 мм × 4,6 мм; елюент: трет-бутил метиловий етер/метанол 85:15; швидкість потоку: 1,0 мл/хв.; температура: 40 °С; УФ виявлення: 220 нм]:  $R_t=6,37$  хв., е.н. >99 %.

РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,67$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 341,2 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$  (%) = 339,1 (100)  $[M-H]^-$ .

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $d_6$ -ДМСО):  $\delta$  (млн.ч.) = 0,40 (м, 3H), 0,48 (м, 1H), 1,36 (м, 1H), 3,83 (с, 3H), 4,54 (д, 2H), 4,68 (м, 1H), 5,07 (т, 1H), 5,25 (д, 1H), 6,74 (с, 1H), 7,00 (с, 1H), 7,03 (д, 1H), 7,47 (д, 1H), 7,89 (с, 1H).

Приклад 43

[4-(4-Аміно-7-ізопропілпіроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-іл)-2,6-дифторфеніл]метанол



Проміжну сполуку 71A (181 мг, 0,709 ммоль), Проміжну сполуку 1A (239 мг, 0,887 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (41 мг, 0,035 ммоль) розчиняли у суміші N,N-диметилформаміду (12,5 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,42 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 130 °С протягом 2 годин у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш фільтрували крізь Celite та концентрували. Отриманий залишок розчиняли у етилацетаті (100 мл) та промивали водою та сольовим розчином (10 мл кожен). Органічний шар висушували над сульфатом натрію, фільтрували та концентрували. Залишок очищали флеш-хроматографією (puriFlash, Interchim, градієнт циклогексан/етилацетат 1:1 до 100 % етилацетату), після чого препаративно ВЕРХ (спосіб 6). Фракції, що містили продукт, об'єднували та рН доводили до лужного значення, використовуючи насичений водний розчин карбонату натрію. Ацетонітриловий розчинник видаляли, та осаджений продукт збирали фільтруванням. Вихід: 69 мг (31 % теор.).

ВЕРХ (спосіб 9):  $R_t=1,35$  хв.;

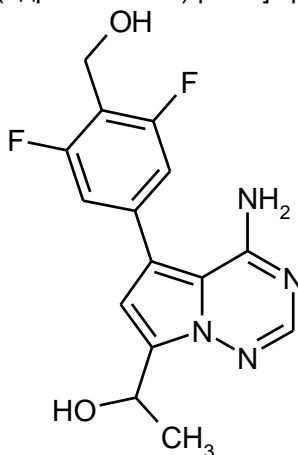
РХ-МС (спосіб 10):  $R_t=0,90$  хв.; МС (ESIpos):  $m/z$  (%) = 319,0 (100)  $[M+H]^+$ , МС (ECIneg):  $m/z$

(%) = 317,0 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО): δ (млн.ч.) = 1,30 (д, 6H), 3,42 (м, 1H), 4,54 (с, 2H), 5,26 (с, 1H), 6,65 (с, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

Приклад 44

5 Рац-1-{4-Аміно-5-[3,5-дифтор-4-(гідроксиметил)феніл]піроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-іл}етанол



Проміжну сполуку 72A (230 мг, 0,743 ммоль), Проміжну сполуку 2A (192 мг, 0,89 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) (86 мг, 0,074 ммоль) розчиняли у суміші 1,4-діоксану (4,6 мл) та 2 М водного розчину карбонату натрію (1,16 мл) у реакційній колбі для мікрохвильової пічки. Реакційну колбу закривали ізолюючою кришкою, та суміш нагрівали до 140 °С протягом години у одномодовій мікрохвильовій пічці. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 8) з одержанням 48 мг матеріалу, який потім очищали препаративною ВЕРХ (спосіб 9). Вихід: 11 мг (4,6 % теор.).

15 РХ-МС (спосіб 5): R<sub>f</sub>=0,89 хв.; МС (ЕСIpos): m/z (%) = 321,3 (100) [M+H]<sup>+</sup>, МС (ЕСIneg): m/z (%) = 319,3 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО): δ (млн.ч.) = 1,47 (д, 3H), 4,54 (м, 2H), 5,16-5,39 (м, 2H), 6,74 (с, 1H), 6,88 (м, 1H), 7,14 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

В. Оцінка біологічної активності

Абревіатури та акроніми:

ATCC	Американська Колекція Культур
АТФ	Аденозинтрифосфат
Бк	Беккерель
BrdU	5-бром-2-деоксиуридин
BSA	Альбумін бичачої сироватки
CHO	Яєчник китайського хом'яка
срм	Кількість на хвилину
Ct	Границя циклу
DMEM/F12	Дульбеко модифіковане середовище Ігла / середовище Хема F12 (1:1)
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
DTT	Дитіотреїтол
EDTA	Етилендіамін-тетраоцтова кислота
ENGs MV	Культуральне середовище капілярних ендотеліальних клітин
FAM	Карбоксифлуоресцеїн сукцинімідоловий естер
FCS	Сироватка ембріону теля
hBMP9	Людський морфогенний фактор 9 кісток
HEPES	4-(2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфонова кислота
HMVEC	Людські капілярні ендотеліальні клітини
HPMC	Гідроксипропілметилцелюлоза
HTRF	Гомогенна флуоресценція з часовим розділенням
HUVEC	Людські судинні ендотеліальні клітини
[I]	Концентрація інгібітора
IC <sub>50</sub>	Концентрація з 50 % інгібування
LDH	Лактатдегідрогеназа

мРНК	Матрична рибонуклеїнова кислота
НАДН	Нікотинамідаденіндинуклеотид
Nonidet P40	4-етилфенокси-полі(етиленгліколь)етер (n=11)
ФСБ	Фосфат забуферений сольовий розчин
ПЕ	Поліетилен
ПЕГ	Поліетиленгліколь
ПК	Піруваткіназа
п.о.	Перорально
кПЛР	Кількісна полімеразна ланцюгова реакція
РНК	Рибонуклеїнова кислота
RTL буфер	RNeasy лізисний буфер
SEQ ID NO	Ідентифікаційний номер послідовності
SFM	Середовище, що не містить сироватку
TAMRA	Карбокситетраметилпропамін
Tris	2-аміно-2-гідроксиметилпропан-1,3-діол
Triton X-100	4-трет-октилфенокси-полі(етиленгліколь)етер (n=10)

Демонстрацію активності сполуки даного винаходу здійснюють за допомогою *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo* аналізів, добре відомих у галузі. Наприклад, для демонстрації активності сполуки даного винаходу, використовували наступні аналізи.

- 5 В-1a. *In vitro* інгібування ферменту, використовуючи сцинтиляцію включеної радіо-мітки (аналіз на flashplate)

Правила тесту:

- Тест сполуки, розведені у ДМСО, змішували з придатним субстратом / спів-субстратом (у даному документі: біотинільований  $\alpha$ -казеїн та  $^{33}\text{P}$ -АТФ) у відповідному буфері для аналізу. Додавання потрібного ферменту (у даному документі: ALK1 кінза) розпочинає ферментативну реакцію. Фермент-каталізоване включення радіо-мітки у субстрат вимірюється за сцинтиляцією. Включену радіо-мітку відділяють від вільної радіо-мітки специфічним зв'язуванням біотинільованого субстрату з стрептавідин-покритими мікротитр-планшетами (flashplates) та супутнім промиванням. Інтенсивність сигналу сцинтиляції (кількість імпульсів на хв., cpm) є пропорційною активності ферменту. Інгібування ферменту приводить до зменшення інтенсивності сигналу. Значення  $\text{IC}_{50}$  тест сполуки визначали за допомогою діаграм cpm-проти- $[\text{I}]$ .

Реакційний буфер:

- Реакційний буфер містить 50 мМ Tris pH 8,0 (Sigma), 1 мМ  $\text{MnCl}_2$  (Sigma), 0,01 % Nonidet P40 (Fluka), 0,5  $\times$  повні інгібітори протеаз, вільні від EDTA (Roche; містить суміш кількох інгібіторів протеаз для інгібування серину та цистеїн протеазу (проте не метало-) протеази; 1 таблетка містить достатню кількість інгібіторів протеаз для 50 мл клітинного екстракту; використана у цьому аналізі концентрація відповідає 1 таблетці у 100 мл).

Інші буфери:

- 25 1.) стоп розчин: фосфатно-сольовий буфер Дульбеко (PAA, Pasching, Austria), 25 мМ EDTA (Sigma), 25 мкМ АТФ (Roche), 0,05 % Triton X-100 (Sigma);  
2.) буфер насичення: фосфатно-сольовий буфер Дульбеко (PAA, Pasching, Austria), 100 мкМ АТФ (Roche), 0,2 % Triton X-100 (Sigma);  
3.) промивний буфер: фосфатно-сольовий буфер Дульбеко (PAA, Pasching, Austria).

- 30 Ферментативний розчин:

ALK1 (Invitrogen, Paisley, Великобританія) базовий розчин (35,7 нг/мкл) розводили до 4 нг/мкл; кінцева концентрація у реакції становила 1 нг/мкл.

Субстратний розчин:

- 35 Дефосфорильований  $\alpha$ -казеїн (Sigma) біотинілювали за протоколом виробника (Pierce, Бонн, Германія) з одержанням вихідного розчину 61,6 мкМ. Коротко, реагент EZ-Link® Sulfo-NHS-Biotin (сульфосукцинімідил-6-(біотинамід)гексаноат; Pierce, Бонн, Германія) додавали у однаковій молярності з  $\alpha$ -казеїном та інкубували на льоду протягом 2 год. Потім, біотиновий реагент видаляли діалізом (2  $\times$  2 год. та протягом ночі).

- 40 100 мМ розчин охолодженого (неміченого) АТФ (Roche) розводили 1:100 перед кожним тестом. Для змішування з субстратом,  $\alpha$ -казеїн розводили до 2,22 мкМ з одержання кінцевої концентрації 1 мкМ  $\alpha$ -казеїну у реакції. Додатково, додавали охолоджений АТФ з одержанням 1,11 мкМ розчину з отримання кінцевої концентрації 500 нМ у реакції.

Радіоактивний розчин АТФ:

Вихідний розчин (9,25 МБк/25 мкл  $^{33}\text{P}$ -АТФ; Perkin Elmer, Rodgau, Германія) розводили до

651,2 Бк/мкл. Це відповідало кінцевій концентрації 162,8 Бк/мкл.

Розчин сполуки:

Сполуки розводили у 100 % ДМСО (10 мМ вихідний розчин) та розводили до 2 мМ. Подальші розведення здійснювали поступово 1:3,16 у ДМСО.

5 По-стадійний протокол:

Об'єм 9 мкл розчину субстрату додавали у кожну лунку 384-лункового мікротитр-планшету (Greiner Bio-One, Solingen, Германія). Додавали 1 мкл розчину субстрату та 5 мкл радіоактивного розчину АТФ. Ферментативна реакція розпочиналась додаванням 5 мкл ферментативного розчину. Суміш інкубували протягом 60 хв. при кімнатній температурі та потім зупиняли додаванням 10 мкл стоп-розчину. 384-лункові мікротитр-планшети flashplates (Perkin Elmer, Rodgau, Германія) насичували 50 мкл буферу для насичування на лунку протягом щонайменше 60 хв. Потім, об'єм 20 мкл відкидали та заміщали 20 мкл зупиненої ALK1 реакційної суміші. Зв'язування біотинільованого субстрату з планшетом flashplate здійснювали протягом ночі, інкубуючи при кімнатній температурі. Зв'язаний субстрат відділяли від незв'язаних компонентів за допомогою повторюваних стадій промивання (3 × 50 мкл промивального буферу на лунку). Наприкінці, додавали 50 мкл промивального буферу, та вимірювали сигнал сцинтиляції (срт) у придатному лічильнику (Perkin Elmer, Rodgau, Германія).

Значення IC<sub>50</sub> окремих сполук даного винаходу наведені на Таблиці 1 нижче:

Таблиця 1

№ Прикладу	ALK1 IC <sub>50</sub> [нМ]
1	2,0
2	2,8
3	4,0
4	1,0
5	1,3
6	40
7	2,0
8	4,4
9	5,7
10	8,0
11	1,9
12	5,9
13	4,0
14	5,3
15	60
16	2,6
17	2,0
18	80
19	19
20	30
21	25
22	17
23	30
24	140
25	65
26	30
27	70
28	170
29	1,0
30	2,0
31	4,0
32	4,0
33	15
34	4,1
40	3,2
41	3,5
42	1,2
43	1,9
44	3,8

20

B-1b. Аналіз ALK1 кінази (ProKinase протокол)

Активність ALK1 (Invitrogen, Карлсбад, CA, США) кінзи вимірювали у ProQinase GmbH (Фрайбург, Німеччина) у радіометричному аналізі, використовуючи  $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ -АТФ та казеїн (Sigma, St. Louis, MO, США) як субстрат у 96-лункових планшетах PerkinElmer FlashPlates™ (Boston, MA, США). Сполуки тестували в 10 концентраціях в діапазоні від  $1 \times 10^{-4}$  М до  $3 \times 10^{-9}$  М у загальному об'ємі 50 мкл з кінцевою концентрацією ДМСО 1 % у кожній. Компоненти аналізу змішували в порядку:

- 20 мкл аналізуючий буфер (70 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 2 мМ ортованадат натрію, 1,2 мМ DTT);
- 5 мкл  $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ -АТФ (1,0 мМ у воді, приблиз.  $6 \times 10^5$  cpm на лунку);
- 5 мкл розчину тест сполуки (у 10 % ДМСО);
- 10 мкл субстрату (200 мг/мл, 1,0 мкг/50 мкл кінцева концентрація) / фермент (4 мг/мл, 20 нг/50 мкл = 5,5 нМ кінцева концентрація) розчин (суміш 1:1).

Реакційні суміші інкубували при 30 °C протягом 60 хв. та зупиняли додаванням 50 мкл 2 % (о./о.) фосфорної кислоти. Планшети аспірували та промивали двічі 200 мкл 0,9 % (м./о.) хлоридом натрію. Включення  $^{33}\text{P}$  визначали лічильником сцинтиляції мікропланшети (Microbeta, Wallac). Всі аналізи здійснювали, використовуючи систему BeckmanCoulter/SAGIAN™ Core System.

Середні значення, одержані з неспецифічного зв'язування субстратом міченого АТФ, брали як за базовий рівень, у той час як середні значення, виміряні за відсутності будь-якого інгібітору, відображають повну активність ALK1 кінзи. Значення базової активності (ba) віднімали від значень повної активності (fa), а також від значень, одержаних з тест сполук, що містили зразки (активність тест сполуки, tca). Залишкову активність в останніх розраховували наступним чином:

$$\text{Залишкова активність (\%)} = 100 \times [(tca-ba)/(fa-ba)]$$

Залишкова активність для кожної концентрації та значення  $\text{IC}_{50}$  сполук розраховували, використовуючи Quattro Workflow V3,1,0 (Quattro Research GmbH, Munich, Німеччина). Придатною моделлю для визначень  $\text{IC}_{50}$  була "сигмоїдальна відповідь (перемінна крутизна)" з параметрами "верхівка" при 100 % та "дно" при 0 %. Використаним способом підбору був підбір методом найменших квадратів.

Типові значення  $\text{IC}_{50}$  цього аналізу наведені на Таблиці 2 нижче:

Таблиця 2

№ Прикладу	ALK1 $\text{IC}_{50}$ [нМ]
7	6,7
11	3,0
28	124
35	6,9
36	21
37	< 3
38	4,0
39	5,7

В-2а. Індукція гену мішені Smad7: клітинний аналіз HMVEC та аналіз експресії TaqMan

Активация ALK1 рецепторів за допомогою BMP9 викликає сигнальний шлях Smad1/5 та збільшує експресію генів мішеней Smad6, Smad7 та Id-1. Індукцію Smad7-мРНК у BMP9-стимульованих ендотеліальних клітинах визначали для контролю клітинної активності інгібіторів ALK1 кінзи.

Людські капілярні ендотеліальні клітини (HMVECadult, Cell Systems, St. Katharinen) сіяли у повне ENG S MV середовище з усіма добавками (LifeLine Cell Technology) у 96-лункові планшети густиною 10 000 клітин на лунку. Через 4 години інкубування при 37 °C та 7,5 %  $\text{CO}_2$  у зволоженому інкубаторі, середовище заміняли мінімальним середовищем (ENG S MV без добавок, що містять 0,02 % FCS). Через 16 годин тест сполуки або середовище (контролі) додавали до культур, через 30 хв. після цього додавали hBMP9 (R&D Systems). Середовище видаляли через 1-4 години, планшети ретельно промивали фосфатним-забуферним сольовим розчином, та клітини лізували 150 мкл на лунку охолодженого на льоду RLT буферу (Qiagen).

Загальну клітинну РНК відділяли за протоколом реагенту Trizol® за рекомендаціями виробників (Invitrogen, США) та обробляли DNaseI для видалення домішок геномної ДНК.

Для відносного кількісного аналізу розподілення мРНК hSmad7, загальну РНК кожного зразка спочатку зворотно-транскрибували, використовуючи систему ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, США) за протоколом виробників. Кінцевий об'єм встановлювали

на рівні 200 мкл водою.

Для відносного кількісного аналізу вибраної мРНК, систему Applied Bioscience ABI 7900HT Sequence Detection System використовували за специфікаціями та протоколами виробників. Реакції ПЛР здійснювали для підрахунку hSmad7- та конститутивного гену L32-мРНК. Прямі та зворотні праймери та зонди для hSmad7 та L32 розробляли, використовуючи програмне забезпечення Applied Bioscience ABI Primer Express™ та синтезували за допомогою Eurogentec (Belgium). Послідовність прямого праймеру hSmad7 була: Праймер 1 (SEQ ID NO 1). Послідовність зворотнього праймеру hSmad7 була: Праймер 2 (SEQ ID NO 2). Зонд 1 (SEQ ID NO 3), мічений FAM як барвником репортера та TAMRA як гасником люмінесценції, використовували як зонд для hSmad7. Послідовність прямого праймеру L32 була: Праймер 3 (SEQ ID NO 4). Послідовність зворотнього праймеру L32 була: Праймер 4 (SEQ ID NO 5). Зонд 2 (SEQ ID NO 6), мічений FAM як барвником репортера та TAMRA як гасником люмінесценції, використовували як зонд для L32.

Перелік SEQ ID:

		5' - 3'
SEQ ID NO 1	hSmad7 праймер 1 (прямий праймер)	CCCTCCTTACTCCAGATACCC
SEQ ID NO 2	hSmad7 праймер 2 (зворотній праймер)	GGAGGAAGGCACAGCATCT
SEQ ID NO 3	hSmad7 зонд 1	TTTTCTCAAACCAACTGCAGACTGTCC
SEQ ID NO 4	L32 праймер 3 (прямий праймер)	AAGTTCATCCGGCACCAGTC
SEQ ID NO 5	L32 праймер 4 (зворотній праймер)	TGGCCCTTGAATCTTCTACGA
SEQ ID NO 6	L32 зонд 2	CCCAGAGGCATTGACAACAGGG

Наступні реагенти, одержані у загальній кількості 20 мкл, додавали на лунку: 1 × кПЛР-MasterMix (Eurogentec, Бельгія) та hSmad7 прямий та зворотній праймери кожен у кількості 200 нМ, 200 нМ hSmad7 FAM/TAMRA-мічений зонд 1 (SEQ ID NO 3), та 5 мкл матриці кДНК. Відповідно, другу суміш у загальній кількості 20 мкл одержували, використовуючи L32 FAM/TAMRA-мічений зонд 2 (SEQ ID NO 6) та L32 прямий та зворотній праймери, додані на лунку у паралельних зразках.

Параметри циклічної термообробки були: 2 хв. при 50 °C, після чого 10 хв. при 95 °C, після чого 40 циклів плавлення при 95 °C протягом 15 сек., та гібридизація/подовження при 60 °C протягом хвилини.

Розрахунок відносної експресії:

Значення Ct (cycle threshold) розраховували з точки повороту кількісних кривих ПЛР продукту за способом  $\Delta\Delta Ct$  (дельта-дельта Ct):  $\Delta Ct = Ct_{hSmad7} - Ct_{L32}$ ; відносна експресія =  $2^{(15 - \Delta Ct)}$ .

Значення  $IC_{50}$  тест сполук розраховували на основі відносної експресії Smad7 при різних концентраціях сполук. Типові значення наведені на Таблиці 3 нижче:

Таблиця 3

№ Прикладу	hSmad7 $IC_{50}$ [нМ]
1	100
2	125
3	180
5	150
7	130
8	60
11	90
17	120
20	4400
21	6000
22	800

В-2b. Індукція гену мішені Smad7: клітинний аналіз HUVEC та аналіз експресії TaqMan

Активність in vitro інгібіторів ALK1 тестували у клітинному аналізі. Морфогенетичний протеїн кісток 9 (BMP9) викликає експресію мРНК Smad7 в людських судинних ендотеліальних клітинах (HUVEC) через активацію ALK1.

1,5 × 10<sup>4</sup> пасажів 2 HUVECs (Lonza, Базель, Швейцарія) на лунку сіяли у 96-лунковий планшет у EBM-2 середовище, що містило добавки EGM-2 та фактори росту (Lonza, CC-3156 та



CC-4176). Через 4 год., середовище замінювали на EBM-2 з 0,2 % сироватки ембріону теля (FCS), та клітини виснажували протягом 20 год. у зволоженому інкубаторі при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Тест сполуки додавали в 11 різних концентраціях від 0 до 10 000 нМ за годину до стимулювання клітин рекомбінантним людським протеїном BMP9 у кількості 1 нг/мл (розведений у 4 мМ хлор водневій кислоті, 0,1 % BSA у кількості 10 мг/мл; R&D Systems, Мінеаполіс, MN, США, 3209BP) протягом 3 год. Середовище видаляли, та клітини лізували у 100 мкл RLT буферу (Qiagen, Hilden, Германия). РНК відділяли, використовуючи набір Qiagen RNeasy 96 Kit (order-No. 74182) за інструкціями виробників та елюювали з колонок 65 мкл РНКза-вільної води. Зворотну транскрипцію для кількісної ЗТ-ПЛР здійснювали за допомогою набору Omniscript Kit (Qiagen, 205113) у РНКза-вільних 96-лункових планшетах з круглим дном. На лунку 6,8 мкл основної реакційної суміші, яка містила 2 мкл 10x RT-буфер, додавали 2 мкл dNTPs (5 мМ кожна), 1,6 мкл випадкового праймеру N6 (125 мМ), 0,25 мкл Rnase Out (40 Од./мкл) та 1 мкл зворотної транскриптази Omniscript Reverse Transcriptase. Після додавання 13,2 мкл суміші РНК/вода, вміст планшет змішували, інкубували протягом години при 37 °C та загальний об'єм доводили до 100 мкл у кожній лунці додаванням 80 мкл РНКза-вільної води.

Кількісний аналіз людської Smad7 мРНК здійснювали на TaqMan, використовуючи Eurogentec cPCR Mastermix Plus (RT-QP2X-03-075+; Cologne, Германия) та застосовуючи людський L32 як конститутивну контрольну мРНК. На кПЛР реакцію додавали 2,8 мкл суміші праймерів, 10 мкл основної суміші, 2,2 мкл води та 5 мкл кДНК. Параметрами температурного циклу були 2 хв. при 50 °C, після чого 10 хв. при 95 °C, після чого 40 циклів плавлення при 95 °C протягом 15 сек. та гібридизація/подовження при 60 °C протягом хвилини.

Рівні Smad7 мРНК викликані 1 нг/мл BMP9 без додавання будь-якого інгібітору брали як 100 % індукції, та % інгібування розраховували для кожної тест сполуки відносно цього значення. Для кожної тест сполуки, кожне значення визначали в чотирьох екземплярах. Значення IC<sub>50</sub> визначали, використовуючи Microsoft Excel. Використаний спосіб підгонки включав зважування, вільний ML-fit.

Типові значення IC<sub>50</sub> з цього аналізу наведені на Таблиці 4 нижче:

Таблиця 4

№ Прикладу	hSmad7 IC <sub>50</sub> [нМ]
1	94
2	160
3	120
5	290
7	140
11	180
17	290
20	5900
21	790
22	3100
30	51
37	330
39	500
40	62
41	77
42	6,6
43	27

В-3. Системна ефективність у лазер-викликаній моделі хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Ціллю цього дослідження було встановлення факти чи системне введення один раз на добу (і.р.) тест сполуки приводить до зменшення транссудації та/або хоріоїдальної неоваскуляризації на моделі пацієнтів з лазер-викликанною хоріоїдальною неоваскуляризацією.

З цією метою, відбирали 16 пігментованих Brown-Norway пацієнтів з відсутністю видимих ознак очних дефектів та випадково ділили на дві групи по 8 тварин на кожній. На добу 0, тварин анестезували внутрішньо черевиною ін'єкцією (15 мг/кг ксилазину та 80 мг/кг кетамін). Після інстиляції однієї краплі 0,5 % тропікаміду для розширення зіниць, хоріоїдальну неоваскуляризацію викликали виконанням шести припікань судинної оболонки розміром 75 мкм навкруги сліпої плями правосторонніх очей, використовуючи фотокоагуляцію 532 нм аргонним

лазером при 150 mW протягом 100 мсек. Тест сполуку та контрольний наповнювач (10 % етанол, 90 % ПЕГ 400) вводили один раз на добу внутрішньо черевиною ін'єкцією (i.p.) з дозуванням тест сполуки на рівні 50 мг/кг на добу 0 та 1, та потім продовжували по 20 мг/кг, починаючи з 2 по 23 добу. Масу тіла всіх тварин записували перед початком та раз на добу протягом дослідження.

Ангіографію здійснювали на 21 добу, використовуючи ангиограф Heidelberg's Retinal Angiograph (HRA). Після анестезії та розширення зіниць, барвник 10 % флуоресцеїн натрію підшкірно ін'єктували, та зображення записували через 10 хв. після ін'єкції барвника. Транссудацію флуоресцеїну на ангиограмах оцінювали двома дослідженнями скритим чином та давали оцінку від 0 (без просочування) до 3 (чітке забарвлення).

Після евтаназії на 23 добі, збирали очі та фіксували у 4 % розчині параформальдегіду протягом години при кімнатній температурі. Після промивання, сітківку обережно очищали, та склера-хороїд розташовували на пласкій поверхні та інкубували після блокування FITC-ізолектин В4 антитілом. Розташовані на пласкій поверхні препарати досліджували на флуоресцентному мікроскопі (Axiotom) при довжині хвилі збудження 488 нм. Об'єм хоріоїдальної неоваскуляризації оцінювали морфо метричним аналізом зображень, використовуючи програмне забезпечення Axiovision 4.6.

Для Прикладу 11 як типової сполуки даного винаходу, одержали наступні результати в цій моделі:

	Просочування судин [оцінка ангиографії]	Хоріоїдальна неоваскуляризація об'єм ураження [мкм <sup>3</sup> × 100 000]
Приклад 11	0,68 ± 0,35	3,48 ± 0,40
Контрольний наповнювач	1,7 ± 0,32	5,83 ± 0,55

В-4. Локальна ефективність у лазер-викликаній моделі хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV)

Ціллю цього дослідження було встановлення факти чи локальне введення один раз на добу (очні краплі) тест сполуки приводить до зменшення транссудації та/або хоріоїдальної неоваскуляризації на моделі пацюків з лазер-викликану хоріоїдальною неоваскуляризацією.

З цією метою, відбирали 65 пігментованих Brown-Norway пацюків з відсутністю видимих ознак очних дефектів та випадково ділили на шість різних груп (n-номери, дивитись таблицю нижче). На добу 0, тварин анестезували внутрішньо черевиною ін'єкцією (15 мг/кг ксилазину та 80 мг/кг кетамін). Після інстиляції однієї краплі 0,5 % тропікамідю для розширення зіниць, хоріоїдальну неоваскуляризацію викликали випалюючи шість отворів у сітківці (розрив оболонки Бруха) одного ока на тварину, використовуючи аргонний лазер 532 нм (розмір ураження: 50 мкм; інтенсивність лазера: 150 mW; тривалість стимулу: 100 мсек.). Тест сполуки та контрольні наповнювачі вводили локально двічі на добу вливаючи відповідні очні краплі в уражене око. Тест сполуки дозували наступним чином: 10 мкл композиції очних крапель, що містила 20 мг/мл відповідної тест сполуки суспендували або у 100 % рідкому парафіні, або у водному середовищі (НРМС 15 сР 3,5 %, полісорбат 80 0,5 %, NaCl 0,9 % у воді), наносили на уражене око двічі на добу з інтервалом 10-14 годин протягом повного періоду спостереження 23 доби. Контрольні тварини отримували відповідний наповнювач (100 % рідкий парафін або водне середовище) локально двічі на добу. Масу тіла всіх тварин записували перед початком та раз на добу протягом дослідження.

Ангіографію здійснювали на 21 добу, використовуючи флуоресцентну фундус-камеру (Kowe). У цьому дослідженні, після анестезії та розширення зіниць, підшкірно ін'єктували 10 % флуоресцеїн натрію, та зображення записували через 2 та 10 хв. після введення барвника. Транссудацію флуоресцеїну на ангиограмах оцінювали трьома різними дослідженнями, сліпими щодо розподілення по групам (тест сполука проти наповнювача), та давали оцінку від 0 (без просочування) до 3 (чітке забарвлення).

На 23 добу, тварин вбивали, та збирали очі та фіксували у 4 % розчині параформальдегіду протягом години при кімнатній температурі. Після промивання, сітківку обережно очищали, промивали, блокували та забавлювали FITC-ізолектин В4 антитілом для візуалізації судинної сітки. Потім, склера-хороїд розташовували на пласкій поверхні та аналізували під флуоресцентним мікроскопом (Keyence Biozero) при довжині хвилі збудження 488 нм. Площу (у мкм<sup>2</sup>) хоріоїдальної неоваскуляризації вимірювали, використовуючи програмне забезпечення ImageTool.

Для Прикладів 7 та 11 як типових сполук даного винаходу, одержали наступні результати в цій моделі:

	Просочування судин [оцінка HRA]	Хоріоїдальна неоваскуляризація розмір ураження [ $\text{мкм}^2 \times 10\,000$ ]
Приклад 7 (водний наповнювач; n=9)	$1,49 \pm 0,24$	$6,14 \pm 1,60$
Приклад 7 (парафіновий наповнювач; n=8)	$1,52 \pm 0,21$	$6,21 \pm 0,99$
Приклад 11 (водний наповнювач; n=7)	$1,66 \pm 0,29$	$5,50 \pm 1,38$
Приклад 11 (парафіновий наповнювач; n=12)	$1,41 \pm 0,29$	$6,45 \pm 1,63$
водний наповнювач контроль (n=12)	$1,87 \pm 0,27$	$7,84 \pm 1,09$
парафіновий наповнювач контроль (n=17)	$1,97 \pm 0,19$	$7,00 \pm 1,00$

Хоча винахід описано з посиланням на конкретні варіанти втілення, очевидно, що інші варіанти втілення та зміни можуть винайти фахівці у галузі, не відступаючи від духу та об'єму винаходу. Формула винаходу складена таким чином, щоб включати всі такі варіанти втілення та еквівалентні зміни.

С. Приклади, що відносяться до фармацевтичних композицій

Фармацевтичні композиції даного винаходу описані наступним чином:

Стерильний в.в. розчин:

5 мг/мл розчину бажаної сполуки винаходу одержували, використовуючи стерильну воду для ін'єкцій, та встановлювали рН у разі потреби. Розчин розводили для введення до 1-2 мг/мл стерильною 5 % декстрозою, та вводили як в.в. інфузію протягом приблизно 60 хв.

Ліофілізований порошок для в.в. введення:

Стерильний препарат може бути одержаний з (i) 100-1000 мг бажаної сполуки винаходу як ліофілізований порошок, (ii) 32-327 мг/мл цитрат натрію, та (iii) 300-3000 мг Dextran 40. Препарат відновлюють стерильним сольовим розчином для ін'єкцій або 5 % декстрозою до концентрації 10-20 мг/мл, яку додатково розводять сольовим розчином або 5 % декстрозою до 0,2-0,4 мг/мл, та вводять або як в.в. болюсну дозу або як в.в. інфузію протягом 15-60 хв.

Внутрішньом'язова суспензія:

Наступний розчин або суспензія можуть бути одержані для внутрішньом'язової ін'єкції:

50 мг/мл бажаної вода-нерозчинної сполуки винаходу; 5 мг/мл натрію карбоксиметилцелюлози; 4 мг/мл Tween 80; 9 мг/мл хлориду натрію; 9 мг/мл бензилового спирту.

Капсули з твердою оболонкою:

Велику кількість окремих капсул одержують шляхом наповнення стандартних дво-частинних твердих желатинових капсул кожної по 100 мг бажаної, порошкоподібної сполуки винаходу, 150 мг лактози, 50 мг целюлози та 6 мг стеарату магнію.

Капсули з м'якою желатиною оболонкою:

Одержували суміш бажаної сполуки винаходу у засвоюваній олії, такий як соєва олія, олія насіння бавовнику або оливкова олія, та ін'єктували за допомогою нагнітаючої помпи у розплавлений желатин для утворення м'яких желатинових капсул, що містять 100 мг активного інгредієнта. Капсули промивали та висушували. Бажану сполуку винаходу можна розчинити у суміші поліетиленгліколю, гліцерину та сорбітолу з одержанням суміші вода-змішуваний лікарський засіб.

Таблетки:

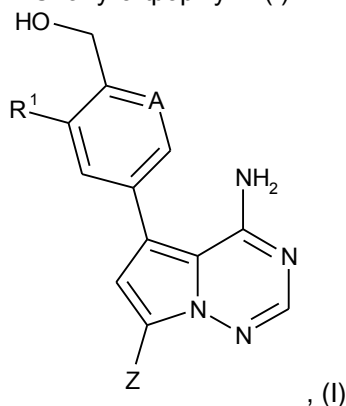
Велику кількість таблеток одержували за стандартними процедурами, так щоб дозована одиниця містила 100 мг бажаної сполуки винаходу, 0,2 мг колоїдного діоксиду кремнію, 5 мг стеарату магнію, 275 мг мікрокристалічної целюлози, 11 мг крохмалю, та 98,8 мг лактози. Відповідні водне та не-водне покриття можуть бути нанесені для підвищення смакової привабливості, покращення форми та стабільності, або затримки абсорбції.

Розчин або суспензія для локального нанесення в око (очні краплі):

Стерильна композиція може бути одержана з 100 мг бажаної сполуки винаходу у вигляді ліофілізованого порошку, відновленого у 5 мл стерильного сольового розчину. Як консерванти можуть бути використані бензалконіум хлорид, тімерозал, фенілртуті нітрат тощо, у діапазоні від приблизно 0,001 мас. % до 1 мас. %.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули (I)



де

A означає N або C-R<sup>2</sup>, де

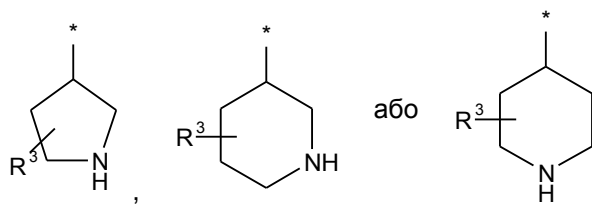
R<sup>2</sup> означає водень, фтор або хлор,

R<sup>1</sup> означає водень, фтор, хлор, метил, етил або метокси,

та

Z означає (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-алкіл або (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-циклоалкіл, кожен з яких може бути заміщеним гідрокси, або

Z означає гетероциклічну групу формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,

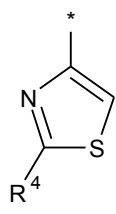
та

R<sup>3</sup> означає водень або гідрокси,

при умові, що, коли R<sup>3</sup> означає гідрокси, цей гідрокси не є приєднаним до атома вуглецю кільця, розташованого поряд з атомом азоту кільця,

або

Z означає триазол формули



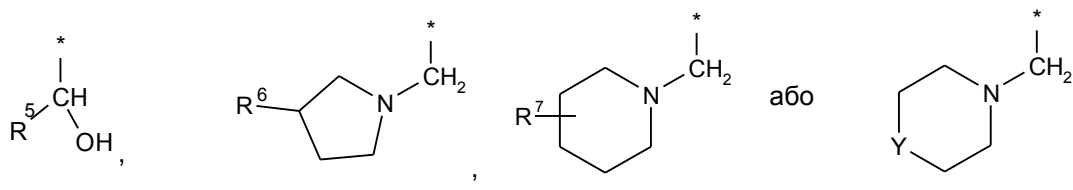
де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,

та

R<sup>4</sup> означає водень, метил, етил, аміно або амінометил,

або

Z означає групу формули



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,

R<sup>5</sup> означає (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-циклоалкіл, оксетаніл, тетрагідрофураніл або тетрагідропіраніл,

R<sup>6</sup> означає водень або гідрокси,

$R^7$  означає водень або гідрокси,  
при умові, що, коли  $R^7$  означає гідрокси, цей гідрокси не є приєднаним до атома вуглецю кільця,  
розташованого поряд з атомом азоту кільця,  
та

- 5  $Y$  означає O, NH або  $NCH_3$ ,  
або її фармацевтично прийнятна сіль, гідрат та/або сольват.

2. Сполука формули (I) за п. 1, де

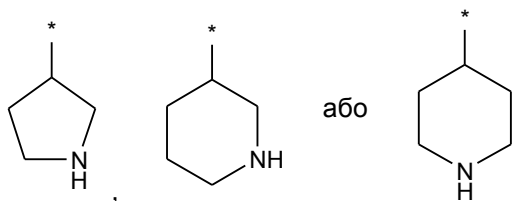
$A$  означає  $C-R^2$ , де

$R^2$  означає водень або фтор,

- 10  $R^1$  означає водень, фтор, хлор, метил, етил або метокси,  
та

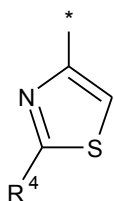
$Z$  означає н-пропіл, н-бутил або циклогексил, кожен з яких може бути заміщеним гідрокси,  
або

$Z$  означає гетероциклічну групу формули



- 15 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
або

$Z$  означає тiazол формули

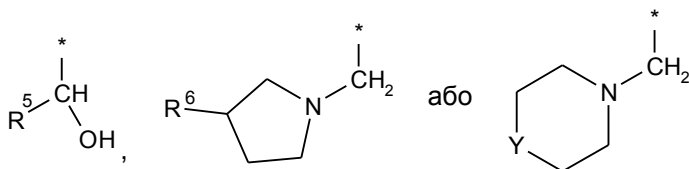


- 20 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та

$R^4$  означає метил, етил, аміно або амінометил,

або

$Z$  означає групу формули



- 25 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
 $R^5$  означає циклопропіл або тетрагідропіран-4-іл,

$R^6$  означає гідрокси,

та

$Y$  означає O,

або її фармацевтично прийнятна сіль, гідрат та/або сольват.

- 30 3. Сполука формули (I) за п. 1 або 2, де

$A$  означає  $C-R^2$ , де

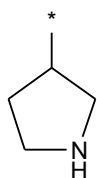
$R^2$  означає водень або фтор,

$R^1$  означає водень, фтор, метил, етил або метокси,

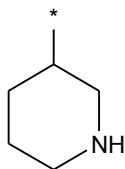
та

- 35  $Z$  означає 4-гідроксибутил або 4-гідроксициклогексил,  
або

$Z$  означає гетероциклічну групу формули

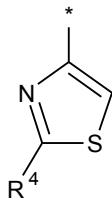


або



де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
або

Z означає тiazол формули

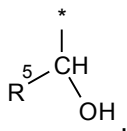


5 де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та

R<sup>4</sup> означає метил, етил, аміно або амінометил,

або

Z означає групу формули



10

де \* вказує на місце приєднання до піролотриазинового залишку,  
та

R<sup>5</sup> означає циклопропіл,

або її фармацевтично прийнятна сіль, гідрат та/або сольват.

15

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601