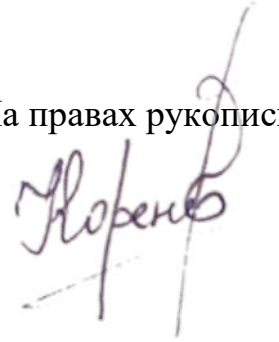
Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«Научно-технологический университет «Сириус»

На правах рукописи

Коренев Георгий



Разработка рациональных стратегий синтеза рисдиплама на основе производных 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты

1.4.3. Органическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
PhD, Иванов Роман Алексеевич

Федеральная территория «Сириус»
2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 4

Глава 1. Литературный обзор 15

1.1 Спинальная мышечная атрофия: от приговора до революционных лекарственных препаратов, модифицирующих течение заболевания 15

1.1.1 Рисдиплам – первый низкомолекулярный пероральный модификатор сплайсинга *SMN2* 21

1.2 Химическая структура рисдиплама – источник ценных строительных блоков для нужд медицинской и органической химии 26

1.2.1 Достижения, ограничения и основные проблемы в синтезе рисдиплама. Подробный сравнительный обзор ключевых подходов к синтезу 30

Глава 2. Обсуждение результатов 47

2.1 Новые ретросинтетические идеи. Выделение ключевого интермедиата 48

2.2 Разработка и оптимизация синтеза сложных эфиров 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты 50

2.2.1 Трехстадийный процесс на основе кротоновой конденсации метилпирувата, снимающий вопрос синтетической недоступности 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты 51

2.2.2 Поиск, преодоление ограничений и оптимизация путей синтеза при получении целевого фрагмента 55

2.3 Разработка модифицированного подхода к синтезу рисдиплама с использованием кислоты Мельдрума 63

2.4 Совершенно новый подход к синтезу рисдиплама за счет образования ядра 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она через производные 3-аминоакрилата 68

2.5 Вопросы полиморфизма, контроля родственных и неорганических примесей, а также остаточных органических растворителей 75

Глава 3. Экспериментальная часть 87

3.1 Методики синтеза и характеризация полученных соединений 89

Глава 4. Заключение и выводы 119

Список сокращений и условных обозначений 121

Список литературы 124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. На протяжении длительного времени спинальная мышечная атрофия (СМА) рассматривалась как неизлечимое заболевание и являлась одной из ведущих генетических причин младенческой смертности. Появление в период с 2015–2020 гг. трёх препаратов различной природы и механизма действия, направленных на таргетную терапию СМА, радикально изменило прогноз выживаемости и качества жизни пациентов, одновременно обострив вопрос доступности подобных высокотехнологичных лекарственных средств для национальных систем здравоохранения.

В данном ряду препаратов особый практический интерес представляет рисдиплам – первый низкомолекулярный, пероральный модификатор сплайсинга гена *SMN2*. Препарат сочетает в себе клинически подтвержденную эффективность при различных фенотипах СМА и возможность длительного амбулаторного применения во всех возрастных группах. Кроме этого, для рисдиплама характерна сравнительно более низкая стоимость по отношению к альтернативным видам терапии и существенно более высокая технологическая реализуемость локализации производства по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами и генотерапевтическими препаратами.

Тем не менее, лекарственные средства для терапии орфанных заболеваний по-прежнему характеризуются исключительно высокой стоимостью, а их цена и ограниченная доступность становятся серьёзным барьером не только для отдельных пациентов, но и для национальных систем здравоохранения в целом. Для Российской Федерации данная проблема приобретает дополнительное стратегическое значение в контексте задач обретения лекарственной независимости и развития полного производственного цикла, включая получение активных фармацевтических субстанций.

В этой связи принципиально важно отметить, что все известные на сегодняшний день подходы к синтезу рисдиплама в той или иной степени

сохраняют зависимость от каскадов реакций, требующих использования дорогостоящих и трудно регенерируемых комплексов палладия. В свою очередь, необходимость жёсткого контроля технологически чувствительных стадий и образование значительных объёмов производственных отходов усложняют масштабирование процесса и повышают себестоимость субстанции, ограничивая привлекательность существующих маршрутов синтеза.

Таким образом, разработка оригинальной и эффективной схемы синтеза рисдиплама и ключевых интермедиатов его получения на основе доступного сырья является чрезвычайно перспективной и актуальной задачей как с точки зрения обеспечения лекарственной независимости страны, так и с точки зрения развития рациональных путей синтеза малых молекул.

Степень разработанности темы. Ключевые синтетические решения, определившие современное развитие подходов к получению рисдиплама, были сформулированы в работах компании-оригинатора – *F. Hoffmann-La Roche Ltd.* Первоначальные подходы были ориентированы прежде всего на быстрое получение молекулы-лидера и обеспечение ранних этапов клинической разработки. В основу данных подходов были положены Pd-катализируемые реакции кросс-сочетания, главным образом по типу реакции Сузуки, использовавшиеся для построения ключевых гетероциклических фрагментов молекулы. Вместе с тем, ранние варианты синтеза характеризовались рядом существенных ограничений, включая неудовлетворительную региоселективность отдельных превращений и жёсткие условия их проведения. Последующая необходимость многократных операций хроматографической очистки искомых продуктов заметно осложняла технологическую адаптацию этих схем.

В последнее десятилетие были предложены как усовершенствованные самим разработчиком варианты синтетических маршрутов, так и отдельные технологические решения, направленные на повышение выхода, варьирование химической природы защитных групп и совершенствование методологий контроля состава и природы примесей.

В результате, к настоящему времени сформировался значительный объём научных данных, свидетельствующий о существенной степени разработки тематики. Вместе с тем, основное продвижение в области синтеза рисдиплама по-прежнему связано преимущественно с оптимизацией исходных схем, разработанных компанией-оригинатором. Альтернативные опубликованные решения, как правило, носили более частный характер и не привели к разработке оригинальной стратегии синтеза. Несмотря на то, что в совокупности полученные результаты позволили устранить часть ранее существовавших ограничений и обеспечить промышленную реализуемость процесса синтеза рисдиплама, они не сняли всех принципиально важных синтетических и технологических затруднений. По этой причине разработка оригинальных и эффективных подходов к синтезу субстанции рисдиплама и ее ключевых интермедиатов по-прежнему остаётся актуальной научно-практической задачей.

Целью настоящего диссертационного исследования является разработка оригинальных, эффективных и масштабируемых подходов к получению рисдиплама и ключевых интермедиатов его синтеза, не предусматривающих использования комплексов палладия и обеспечивающих получение активной фармацевтической субстанции (АФС), соответствующей требованиям фармакопеи ЕАЭС.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи:**

1. Провести ретросинтетический анализ и сравнительную оценку схем получения молекулы рисдиплама с целью выявления новых ключевых интермедиатов и рациональных путей сборки целевой молекулы;
2. Разработать оригинальные подходы к получению ключевых структурных интермедиатов синтеза рисдиплама: полизамещённых пиридазинов, имидазо[1,2-*b*]пиридазинов и пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-онов на основе доступного сырья, без использования комплексов палладия и хроматографических методов очистки;

3. Экспериментально подтвердить эффективность предложенных синтетических решений и выполнить сравнительную оценку влияния условий проведения ключевых этапов синтеза на выход и чистоту искомых продуктов;
4. Исследовать и оптимизировать условия проведения финальных этапов получения рисдиплама с целью обеспечения их воспроизводимости;
5. Предложить алгоритм выделения и очистки активной фармацевтической субстанции целевой полиморфной формы, соответствующей требованиям фармакопеи ЕАЭС и установленным критериям приемлемости по содержанию родственных органических примесей, неорганических примесей и остаточных органических растворителей.

Научная новизна. Теоретическая и практическая значимость работы.

В результате проведённых исследований были разработаны новые синтетические подходы к построению функциональных производных пиридазина и конденсированных имидазо[1,2-*b*]пиридазиновых систем, представляющих значительный интерес в качестве структурных блоков для направленного синтеза фармакологически активных соединений. Предложенная стратегия основана на последовательном построении молекул названных гетероциклических синтонов из простых и легкодоступных исходных соединений без использования хроматографических методов очистки. В рамках реализации данного подхода был впервые предложен и осуществлён простой и эффективный синтез 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты, а на её основе – бутилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты – нового ключевого структурного блока, который может быть использован в качестве общего предшественника для реализации двух принципиально различных стратегий синтеза рисдиплама.

Синтетической новинкой разработанного подхода стала ранее не описанная последовательность превращений, предусматривающая на начальном этапе формирование пиридазинового ядра путем гетероциклизации гидразина с моноэфиром 2-метил-4-оксопент-2-ендиовой кислоты. Последний получается, в

свою очередь, кротоновой конденсацией метилпирувата – исключительно дешёвого продукта крупнотоннажной химии. Последующее формирование конденсированной имидазо[1,2-*b*]пиридазиновой системы в пять стадий обеспечивает эффективный доступ к широкой выборке функциональных производных соответствующих азагетероциклов. При этом отсутствует необходимость использования реакций палладий-катализируемого кросс-сочетания, в том числе и модифицированного сочетания по Негиши, описанного компанией-оригинатором для получения родственного структурного блока. С учётом широкой области применения указанных структурных блоков во фрагментах лекарственных средств, а также возможностей их дальнейшей функционализации, разработанные подходы представляют значительный научно-практический интерес. В частности, они обеспечивают удобное получение искомых соединений без необходимости промежуточной хроматографической очистки, а также характеризуются технологической простотой и могут быть легко масштабированы.

На основе полученного имидазо[1,2-*b*]пиридазинового фрагмента была реализована модифицированная стратегия синтеза рисдиплама с использованием производных кислоты Мельдрума, в рамках которой впервые в полной мере устранён ряд известных технологических ограничений. Этого удалось достичь, в первую очередь, за счёт кристаллизации на поздних стадиях синтеза двух полупродуктов (ранее не описанных в чистом виде), обеспечивающих робастность процесса и возможность жесткого контроля состава и содержания примесей органической и неорганической природы.

Также, впервые разработана совершенно новая альтернативная стратегия получения известного ключевого интермедиата в синтезе рисдиплама – 7-фтор-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она, основанная на медь-катализируемой гетероциклизации соответствующего 3-аминоакрилата с 2,5-дигалогензамещённым пиридином. Проведённое исследование условий протекания ключевого превращения и предложенный механизм гетероциклизации создают теоретическую основу для использования

разработанного подхода в синтезе широкого спектра родственных соединений. Последние представляют интерес для поиска новых лекарственных веществ, благодаря наличию привилегированных, с позиций медицинской химии, структурных фрагментов. Настоящее исследование также открывает возможность получения описанных выше гетероциклических систем без использования реакций палладий-катализируемого кросс-сочетания, которые на протяжении десятилетий оставались основным способом получения соединений данного хемотипа.

Наконец, показано, что разработанные синтетические подходы обеспечивают возможность построения молекулы рисдиплама в сопоставимое с известными маршрутами число стадий и с конкурентоспособными суммарными выходами при сохранении ключевых показателей качества активной фармацевтической субстанции. В частности, впервые показано, что кратковременная обработка активной фармацевтической субстанции рисдиплама водой после формирования целевой полиморфной формы не приводит к изменению последней и позволяет эффективно решить проблему повышенного содержания остаточного этанола и неорганических примесей. В настоящее время разработанные подходы к синтезу рисдиплама переносятся на производственную площадку группы компаний «Р-Фарм» с целью локализации производства субстанции в Российской Федерации.

Методология и методы исследования. В настоящей работе использованы классические методы органического синтеза, основанные на ретросинтетическом анализе целевой молекулы и включающие разработку, подбор условий и масштабирование отдельных стадий синтеза с опорой на литературные данные, опубликованные в рецензируемых профильных изданиях. Выделение и очистку продуктов осуществляли методами экстракции, осаждения, перекристаллизации и перегонки. Аналитические образцы целевых соединений в пилотных экспериментах были выделены и очищены с использованием колоночной хроматографии. Структуру полученных соединений устанавливали с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа, в том числе: спектроскопии ЯМР с применением двумерных гетероядерных экспериментов, а также масс-спектрометрии, включая масс-спектрометрию

высокого разрешения. Чистоту полученных соединений и соответствие необходимой полиморфной форме определяли методами ВЭЖХ с УФ-детектированием и порошковой рентгеновской дифракции, соответственно. Все кристаллические образцы были охарактеризованы измерением температуры плавления.

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном выполнении основных этапов диссертационного исследования. Автором проведены поиск, анализ и систематизация научной информации по тематике работы с последующей подготовкой аналитического обзора литературы. Осуществлены постановка задач исследования, планирование и проведение химических экспериментов, синтез, выделение и очистка целевого и промежуточных соединений, а также подготовка образцов для их последующего физико-химического анализа. Автор принимал непосредственное участие в установлении структуры и подтверждении чистоты полученных соединений, включая интерпретацию спектров ЯМР, масс-спектрометрических данных и данных порошковой рентгеновской дифракции. Существенный вклад автора также заключается в обработке и обобщении полученных результатов, формулировании выводов, подготовке материалов к публикации и представлении основных результатов исследования. Во всех опубликованных в соавторстве работах по теме диссертации вклад автора является определяющим.

Положения, выносимые на защиту:

1. Новый исходный структурный фрагмент для синтеза рисдиплама на основе 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты синтезируется из доступного продукта крупнотоннажной химии – метилпирувата, за счет кротоновой конденсации последнего с последующей гетероциклизацией образующегося продукта гидразином;
2. Последовательность превращений 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты, включающая каскад стадий этерификации, дезоксихлорирования, азидирования, восстановления и гетероциклизации, обеспечивает получение алкиловых эфиров 2,8-диметилимидазо[1,2-

b]пиридазин-6-карбоновой кислоты – ключевых интермедиатов и общих предшественников для двух принципиально различных схем получения рисдиплама. Разработанная последовательность реализуется без использования реакций кросс-сочетания, катализируемых комплексами палладия, не требует разделения смесей региоизомеров и хроматографической очистки полупродуктов синтеза;

3. Модифицированный вариант синтеза рисдиплама на основе продукта ацилирования кислоты Мельдрума 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбонилхлоридом, включающий, в частности, стадию дезоксихлорирования с использованием трифосгена и выделение кристаллических полупродуктов в контрольных точках процесса, позволяет устранить ключевые технологические ограничения оригинального маршрута и приводит к воспроизводимому способу получения АФС, соответствующей требованиям фармакопеи ЕАЭС;
4. Медь-катализируемая гетероциклизация 3-амино-3-(2,8-диметилимидазо-[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)акрилата с 2,5-дигалогензамещённым пиридином в присутствии 1,10-фенантролина создаёт синтетическую альтернативу описанному ранее получению 7-фтор-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она – предпоследнего интермедиата в синтезе рисдиплама;
5. Экстракция остаточных органических растворителей и неорганических примесей водой из уже сформированных кристаллов активной фармацевтической субстанции рисдиплама не приводит к изменению целевой полиморфной формы и обеспечивает соответствие требованиям фармакопеи ЕАЭС.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Настоящая диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.4.3. «Органическая химия» в части следующих пунктов: выделение и очистка новых соединений (п. 1), развитие рациональных путей синтеза сложных молекул (п. 3), а также выявление закономерностей типа «структура – свойство» (п.7).

Представленные в работе результаты, связанные с разработкой новых подходов к получению рисдиплама и ключевых интермедиатов его синтеза, исследованием условий протекания ключевых химических превращений, а также выделением, очисткой, установлением и подтверждением структуры полученных соединений, полностью соответствуют области исследований указанной научной специальности.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных физико-химических методов анализа, взаимной согласованностью экспериментальных данных, а также воспроизводимостью разработанных синтетических методик. Строение и чистота соединений, рассматриваемых в диссертационной работе, подтверждены данными спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, в том числе с привлечением двумерных корреляционных экспериментов (HSQC, HMBC), масс-спектрометрии, включая масс-спектрометрию высокого разрешения, а для характеристики полиморфной формы активной фармацевтической субстанции – данными порошковой рентгеновской дифракции. Для оценки чистоты целевой субстанции использовали метод ВЭЖХ с УФ-детектированием, при этом количественную оценку содержания основного вещества и уровня родственных примесей проводили методом нормализации.

В диссертацию включены научные результаты, полученные соискателем при выполнении исследований в рамках реализации гранта Российского научного фонда № 23-90-04000 «Проведение пилотных проектов НИОКР в рамках стратегических инициатив Президента Российской Федерации в научно-технологической сфере» по теме: «Разработка технологий синтеза субстанций орфанных препаратов на основе малых молекул» 2023-2025 гг., руководитель НИОКР – PhD, председатель Ученого совета, директор Научного центра трансляционной медицины, Р.А. Иванов.

Публикации по теме диссертации. По результатам исследования было опубликовано 3 статьи [1–3] в международных рецензируемых научных изданиях,

относящихся к 1 уровню «Белого списка» ВАК РФ и *Q1* по метрике реферативных баз Scopus и Web of Science. Диссертантом в соавторстве получено 2 патента РФ на изобретение [4, 5].

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из семи разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 138 страницах, содержит 33 рисунка и 4 таблицы. Список литературы включает 136 наименований.

Благодарности.

Автор выражает искреннюю благодарность всем коллегам, чья помощь, участие и поддержка способствовали выполнению настоящей диссертационной работы. Прежде всего, автор глубоко признателен Гутеневу А.А. (старшему инженеру-исследователю Ресурсного центра медицинской химии НТУ «Сириус») за плодотворное сотрудничество в выполнении значительного объёма синтетических исследований и многолетнюю совместную работу. Особые слова благодарности автор выражает к.х.н. Чернышову В.В. (научному сотруднику лаборатории доклинических исследований МФТИ) и д.х.н., к.фарм.н., профессору Навроцкому М.Б. (руководителю группы медицинской химии отдела медицинской и биологической химии ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН) за участие в концептуализации отдельных направлений исследования, плодотворное научное обсуждение полученных результатов и помощь в подготовке и оформлении научных публикаций.

Автор также выражает признательность Цандур А.А. и Пушкину С.В. (старшим инженерам-исследователям направления «Медицинская биотехнология» Научного центра трансляционной медицины и Ресурсного центра медицинской химии НТУ «Сириус») за помощь в проведении аналитических исследований полученной АФС рисдиплама и её ключевых интермедиатов различными хроматографическими методами. Отдельную благодарность автор выражает Головину Е.В. (ведущему инженеру-исследователю Ресурсного центра аналитических методов НТУ «Сириус») за проведение комплекса ЯМР-

экспериментов, а также к.ф.-м.н., доценту Кяшкину В.М. (старшему научному сотруднику Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва) за проведение исследований субстанции методом порошковой рентгеновской дифракции.

Особую и искреннюю благодарность автор выражает своему научному руководителю PhD, Иванову Роману Алексеевичу (председателю Учёного совета НТУ «Сириус» и директору Научного центра трансляционной медицины) за наставничество, оказанное доверие, постоянную поддержку и неоценимую помощь в организации и проведении настоящего диссертационного исследования.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Спинальная мышечная атрофия: от приговора до революционных лекарственных препаратов, модифицирующих течение заболевания

Спинальная мышечная атрофия (СМА) представляет собой тяжёлое прогрессирующее наследственное нейромышечное заболевание, регистрируемое в клинической практике с частотой 1 случай на 6–10 тыс. новорождённых [6, 7]. У более чем 98% пациентов со СМА заболевание обусловлено гомозиготной делецией гена *SMN1*. Полноразмерная мРНК, транскрибируемая с данного гена, кодирует жизненно важный белок SMN, необходимый для выживания двигательных нейронов [8]. Дефицит данного белка приводит к дисфункции и последующей гибели мотонейронов передних рогов спинного мозга, что нарушает проведение двигательных импульсов от центральной нервной системы к скелетной мускулатуре и определяет клиническую картину заболевания. В неонатальном периоде СМА может протекать и без выраженных клинических проявлений; позднее заболевание превращается в быстро прогрессирующую нервно-мышечную патологию, симптомы которой часто выражаются в виде симметричного вялого паралича и недостаточного либо полностью отсутствующего контроля положения головы [9, 10]. В конечном итоге, при отсутствии своевременной терапии, тяжелые формы заболевания приводят к постоянной зависимости от аппарата искусственной вентиляции легких или к летальному исходу уже в течение первых двух лет жизни [11, 12].

К счастью, ген *SMN* присутствует в геноме человека в нескольких копиях: одна копия *SMN1* (теломерная) и несколько копий *SMN2* (центромерные). У всех пациентов со СМА наблюдается сохранение по меньшей мере одной копии гена *SMN2*, которая транскрибируется в идентичную *SMN1* мРНК, но, лишь в случае 10% транскриптов [8, 13]. В остальных 90%, всего пять нуклеотидных различий

между транскриптами, ключевое из которых – в позиции 6 экзона 7 (Ex7+6) копии *SMN2,* приводят к нарушению регуляции альтернативного сплайсинга, преимущественному исключению экзона 7 из пре-мРНК, и, как следствие, синтезу неполноценного, укороченного белка SMN, который, в случае мутации гена *SMN1*, не может компенсировать недостаток полноразмерного белка [14, 15].

В результате прослеживается устойчивая закономерность: меньшее число копий гена *SMN2* ассоциировано с наиболее тяжёлыми фенотипами спинальной мышечной атрофии (типы 0 и 1), тогда как увеличение числа копий *SMN2* сопровождается смещением клинической картины в сторону промежуточного (тип 2) и более мягких (типы 3 и 4) фенотипов [16]. Вместе с тем данная зависимость не является строго детерминированной, поскольку копии *SMN2* могут быть функционально неэквивалентны: ген подвержен мутационным изменениям, структурным перестройкам и вариациям длины, что приводит к различиям в уровне экспрессии и итоговой продукции белка SMN [17, 18].

Таким образом, ген *SMN2* способен продуцировать полноразмерный функциональный белок лишь при эффективном включении экзона 7 в транскрипт, а увеличение числа копий *SMN2* повышает вероятность и суммарный выход полноразмерного продукта. Следовательно, воздействие на паттерн сплайсинга *SMN2* с усилением включения экзона 7 представляет собой рациональную и фармакологически управляемую терапевтическую стратегию. Именно подходы, направленные на регуляторные элементы сплайсинга, повышающие включение экзона 7 в матричные транскрипты, продемонстрировали клиническую результативность и стали первой линией «восстановления белка SMN», получившей регуляторное одобрение.

Важно понимать, что стандартное исключение экзона 7 из транскрипта *SMN2* регулируется участком соответствующего интрона 7, обозначаемым как интронный сайленсер сплайсинга N1 (ISS-N1) и расположенным непосредственно ниже по цепи от 5′-конца сайта сплайсинга вышеупомянутого экзона (Рисунок 1). При этом, удаление последовательности ISS-N1 неизменно приводит к значимому увеличению частоты включения экзона 7 в соответствующую м-РНК [19].

Следовательно, манипуляции над подобными регуляторными областями с помощью коротких комплементарных последовательностей синтетических нуклеотидов могут представлять перспективный терапевтический подход [20].

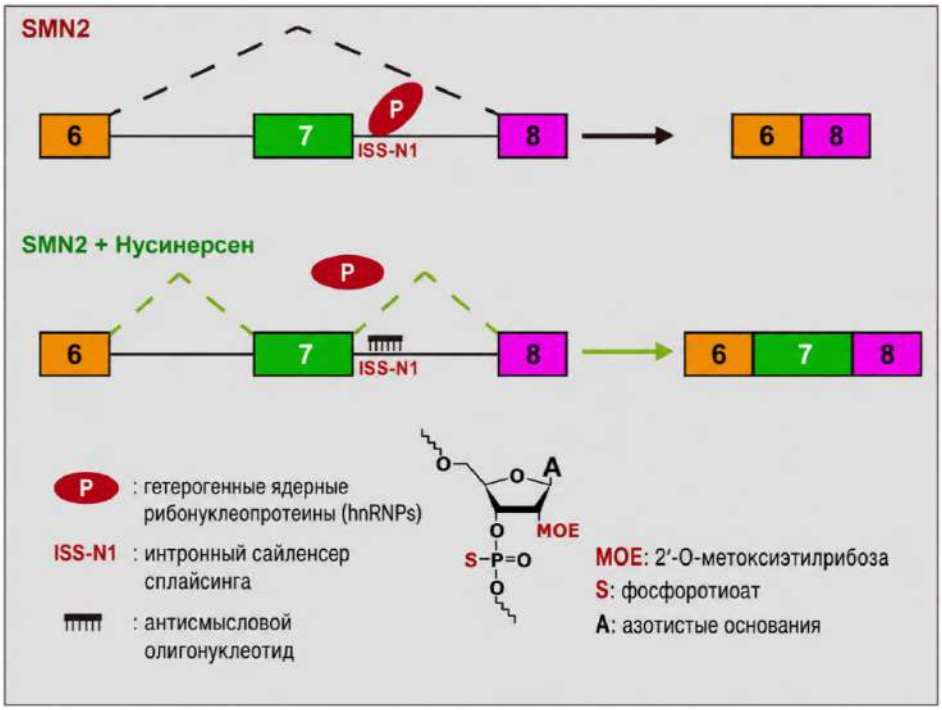


Рисунок 1 – Механизм действия нусинирсена – антисмыслового олигонуклеотида, который образует пары оснований с ISS-N1, предотвращая связывание репрессора и тем самым способствуя включению экзона 7 в м-РНК

Для определения наиболее эффективной целевой последовательности, обеспечивающей включение экзона 7, в экспериментах на мышах была протестирована серия антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), причём целевая последовательность шаг за шагом «сдвигалась» вдоль участка-мишени на один нуклеотид [21]. В результате было найдено наиболее активное состояние (в позиции 10–27 интрона 7), реализуемое за счет введения 18-мера 2′-О-метоксиэтил-модифицированного АСО (Рисунок 1) в мягкой модели СМА на эмбриональной, неонатальной и взрослой стадиях. Уровни белка SMN при этом возрастали, а специфический АСО-10–27 оказался способен резко улучшать продолжительность жизни, двигательную функцию и физиологию мышц при системном либо внутрижелудочковом (в желудочки головного мозга) введении [22, 23].

В конечном итоге, успешные результаты доклинических и клинических испытаний привели к одобрению FDA и EMA препарата нусинерсен в декабре 2016 г. и июне 2017 г. соответственно. Он стал первым лекарственным средством для лечения пациентов с 5q-спинальной мышечной атрофией типов 1–3.

Однако, несмотря на доказанную клиническую эффективность, нусинерсен имеет ряд принципиальных ограничений, которые снижают его ценность в реальной медицинской практике. Во-первых, препарат требует пожизненного режима повторных интратекальных инъекций, а сама люмбальная пункция ассоциируется с типичными процедурными нежелательными явлениями (головная боль, рвота, боль в спине). Данные факторы формируют хроническую процедурную нагрузку, а результат терапии полностью зависит от инфраструктуры и опыта медицинского центра, подразумевая исключительно стационарное лечение. Во-вторых, в литературе подчёркиваются класс-специфические риски АСО, включая тромбоцитопению/коагулопатию и потенциальную нефротоксичность, которые требуют регулярного лабораторного мониторинга. В-третьих, несмотря на фармакологическую таргетность нусинерсена к ЦНС, существует проблема неоднородного распределения препарата: так в образцах ряда пациентов описана вариабельность концентраций АСО и ограниченная распространенность в ростральных отделах спинного и головного мозга, что рассматривается как один из факторов вариабельности ответа и ограниченности эффекта терапии [24]. Наконец, терапия характеризуется экстремально высокой совокупной стоимостью при длительном применении: расходы оцениваются в ~776 тысяч долларов США в первый год и ~388 тысяч долларов США в последующие годы [25]. Одной из причин такой высокой стоимости является синтетическая сложность молекулы, производство которой опирается на многоцикловую твердофазную фосфорамидитную химию и ресурсоёмкую очистку. Считается, что именно ограничения масштабирования синтеза и очистки олигонуклеотидов сегодня являются серьезным барьером для удешевления и расширения доступности таких препаратов [26].

Таким образом, нусинерсен, будучи первым клинически доказанным препаратом для терапии СМА, при несомненной эффективности, характеризуется рядом существенных ограничений, которые обусловили сохранение объективной потребности в дальнейшей оптимизации терапевтических подходов и послужили стимулом к разработке альтернативных стратегий, направленных на повышение доступности и удобства терапии при сохранении её клинической результативности.

Поскольку основной причиной СМА является утрата белка SMN, его «возвращение» в организм человека является самой простой идеей для терапии, однако ввиду сложности ее реализации, в качестве приоритетного варианта рассматривается исключительно генная заместительная терапия. После того, как на примере мышей и приматов, не относящихся к человеку, было показано, что системная доставка посредством внутривенной инъекции адено-ассоциированного вирусного вектора серотипа 9 (AAV9) способна преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [27] и эффективно трансдуцировать клетки-мишени в ЦНС, включая мотонейроны спинного мозга [27, 28], концепция применения вирусных векторов для доставки экзогенных генов в релевантные ткани была распространена и на нейродегенеративные заболевания. Более того, последующая разработка самокомплементарного вектора AAV9 (scAAV9) лишь повышала эффективность и скорость транскрипции на мышиных моделях СМА [29], после чего, при синергии разработанных методов, технология AAV9-опосредованной экспрессии гена *SMN*, доставленного на 1-й постнатальный день, приводила к существенному увеличению продолжительности жизни и уменьшению выраженности двигательных нарушений в моделях СМА [20, 29].

Полученные результаты обусловили начало клинических исследований онасемногена абепарвовека – рекомбинантного AAV9-вектора, кодирующего человеческий белок SMN, вводимого внутривенно [30]. Положительные результаты фазы I и промежуточные данные последующего исследования фазы II/III привели к одобрению препарата FDA в 2019 г. Неоспоримым преимуществом терапии по сравнению с нусинерсеном стала именно однократность введения (вместо многократных интратекальных процедур).

Однако клиническая реализуемость данного преимущества ограничивается тяжёлым и платформенно-специфическим профилем безопасности: установлен риск острого серьёзного поражения печени, требующий системного приема кортикостероидов и интенсивного лабораторного мониторинга функции печени, а также подчёркнуты риски тромбоцитопении и тромботической микроангиопатии [31, 32]. Также важно отметить, что эффективность терапии максимально зависит от времени введения: на доклинических моделях и в клинических программах последовательно подчёркивается преимущество максимально раннего вмешательства, что подтверждается и в пресимптоматическом исследовании, где показана высокая вероятность достижения возрастных моторных вех [33]. При более позднем введении клиническая польза, как правило, становится менее предсказуемой и в большей степени ограничивается уже сформированным необратимым повреждением мотонейронов [34]. Наконец, системное применение фактически не распространяется на взрослую популяцию: в США препарат показан только педиатрическим пациентам младше 2 лет, что отражает не только регуляторные границы доказательной базы, но и фундаментальное ограничение дозозависимой AAV9-платформы у взрослых пациентов [35]. Существенным фактором, ограничивающим широкое применение терапии, также остаётся её чрезвычайно высокая стоимость, достигающая 2,1 млн долларов США за однократное введение препарата [36].

В совокупности все обстоятельства несомненно позволяют рассматривать онасемноген абепарвовек как терапию с исключительным потенциалом при раннем применении, но с существенными ограничениями по безопасности, показаниям и доступности, что сохранило потребность в разработке новых препаратов, обеспечивающих сопоставимую клиническую результативность при более управляемом профиле рисков и большей практической применимости.

1.1.1 Рисдиплам – первый низкомолекулярный пероральный модификатор сплайсинга *SMN2*

Совокупность ограничений, описанных выше подходов к терапии СМА обусловила поиск иного фармакологического подхода, сочетающего системное действие, меньшую стоимость производства, технологическую доступность синтеза и возможность неинвазивного применения. Одним из наиболее значимых результатов реализации данного поиска стало создание перорального модификатора сплайсинга *SMN2* – рисдиплама. Открытие рисдиплама началось с кампании высокопроизводительного скрининга, разработанного для выявления низкомолекулярных соединений, повышающих включение экзона 7 в процессе сплайсинга пре-мРНК *SMN2*. В рамках данного теста в качестве перспективного «хита» было идентифицировано производное кумарина **1** [37]. Последующие этапы оптимизации, направленные, в числе прочего, на устранение негативного сигнала в тесте Эймса *in vitro* и снижение фототоксичности, характерной для данного хемотипа, привели к получению соединения **2** (RG7800) [38]. Далее для соединения **2** были реализованы несколько ключевых улучшений, позволивших получить рисдиплам [39] (Рисунок 2).

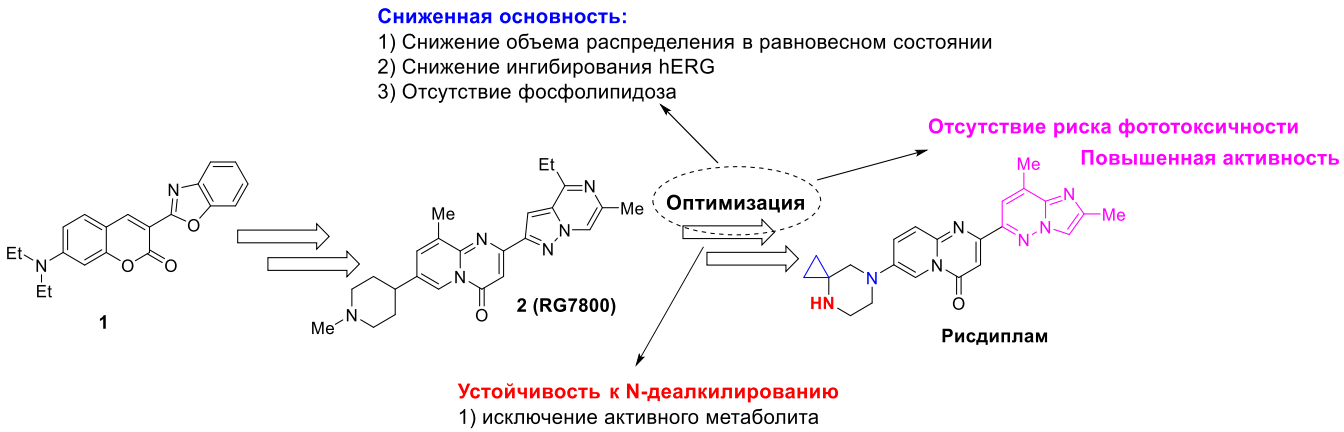


Рисунок 2 – Схема оптимизации молекулы-хита **1**: путь к открытию рисдиплама

Список усовершенствований включал существенное повышение активности соединений в отношении включения экзона 7 в мРНК *SMN2* при одновременном снижении влияния на сплайсинг нецелевых транскриптов, что позволило снизить терапевтически эффективные дозы и благоприятно повлияло на ширину терапевтического окна. Кроме этого, выбор основного аминного фрагмента с максимально низким значением pKa при сохранении активности предотвратил ингибирование hERG-каналов и развитие фосфолипидоза. Полученный в результате оптимизации рисдиплам характеризуется благоприятным фармакокинетическим профилем (в частности, приемлемым периодом полувыведения) и обеспечивает требуемое системное распределение по тканям [40].

Рисдиплам, как и его конкуренты нусинерсен и онасемноген абепарвовек, воздействует именно на генетическую причину СМА. Так как для осуществления сплайсинга, в частности, требуется рекрутирование малого ядерного рибонуклеопротеина U1 (U1 мяРНП) [41], критическим этапом при этом является гибридизация РНК-компонента комплекса U1 мяРНП с высококонсервативным 5′-сайтом сплайсинга на границе экзон–интрон. Хотя определённые отклонения от консенсусной последовательности 5′ss участка в пре-мРНК допускаются, отдельные замещения приводят к ослаблению связывания с U1 мяРНП (Рисунок 3) и вызывают пропуск соответствующего участка при сплайсинге. Исключение экзона 7 в транскрипте *SMN2* является одним из примеров такого пропуска экзона, обусловленного несоответствием последовательностей [42].

Как показано на рисунке 3, соединения типа рисдиплама специфически стабилизируют двуцепочечную РНК-структуру, формируемую 5′ss-сайтом экзона 7 и комплексом U1 мяРНП, тем самым превращая «слабый» 5′-сайт сплайсинга экзона в более «сильный». Было показано, что рисдиплам специфически компенсирует несоответствие последовательностей, повышая аффинность связывания, тем самым обеспечивая исключительную селективность действия [43].

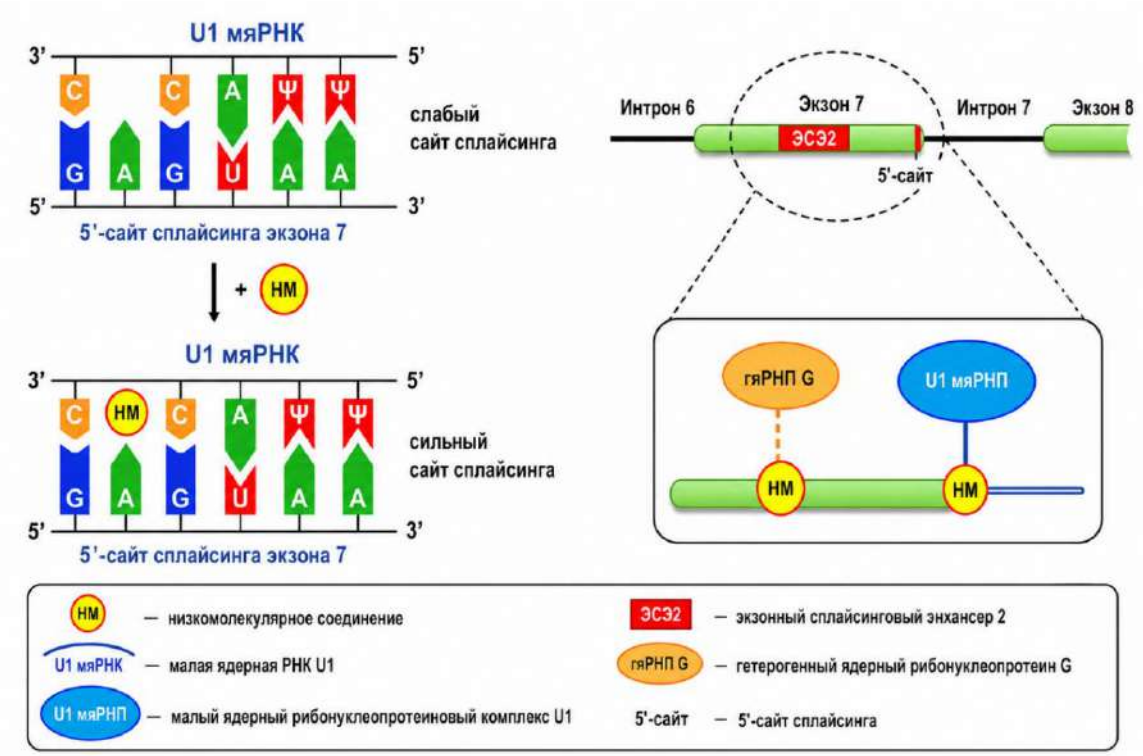


Рисунок 3 – Схематическая модель концепции репарации несовпадений в 5'ss-сайте и модель известных взаимодействий малых молекул-модификаторов сплайсинга *SMN2*

При изучении связывания аналогов рисдиплама с пре-мРНК *SMN2* был идентифицирован и второй мотив в пределах экзона 7, с которым данные соединения связываются селективно. Данный элемент, обозначаемый как второй экзонный энхансер сплайсинга (ЭСЭ2), предположительно вносит дополнительный вклад в повышенную специфичность по отношению к *SMN2* [44].

Безопасность и эффективность рисдиплама были подтверждены в рамках комплексной программы клинической разработки. В ключевом исследовании FIREFISH, посвящённом применению рисдиплама при СМА у новорожденных, 41% получавших терапию младенцев достигли способности сидеть без опоры в течение ≥5 с к 12-му месяцу, а 90% пациентов не нуждались в постоянной вентиляции лёгких, что подтвердило эффективность рисдиплама при наиболее тяжёлом фенотипе [45, 46].

Рандомизированное плацебо-контролируемое исследование SUNFISH, в свою очередь, также продемонстрировало статистически значимое улучшение

двигательной функции у пациентов с более мягким фенотипом (типы 2 и 3), при этом наибольшая выраженность эффекта отмечалась у более молодых участников [47]. В исследовании JEWELFISH были получены данные по безопасности у пациентов, ранее получавших другие виды терапии СМА. В рамках исследования было показано сохранение переносимости терапии в течение 24 месяцев с уменьшением частоты нежелательных явлений на втором году наблюдения, что подтвердило целесообразность применения рисдиплама в качестве долговременной терапии [48, 49]. В исследовании RAINBOWFISH было установлено, что пресимптоматические пациенты, получавшие рисдиплам, развивались в соответствии с возрастной нормой, что способствовало более широкому внедрению программ неонатального скрининга СМА [50–52].

Наконец, в сентябре 2025 г. в общенациональном исследовании были представлены результаты применения рисдиплама у взрослых пациентов: у больных СМА, преимущественно 2-го (40,4%) и 3-го (47,4%) типов, при медиане возраста 35,7 лет и медиане длительности заболевания 29,6 года, отмечались устойчивые клинически значимые функциональные улучшения, наиболее отчётливо проявлявшиеся после 18 месяцев терапии. Эти данные подтвердили возможность длительного поддерживающего лечения рисдипламом у взрослых и в существенной мере ликвидировали ранее обозначенный дефицит доказательств для данной категории пациентов [53].

В результате режим однократного ежедневного перорального приёма в домашних условиях, в сочетании с эффективностью при всех фенотипах СМА для всех категорий пациентов, при низкой частоте побочных эффектов за счет исключительной селективности и при самой низкой стоимости курса лечения (порядка 330 тыс. долларов США в год), позволяют рассматривать рисдиплам как флагман амбулаторной терапии всех форм СМА.

Клиническая практика последних лет убедительно показала, что модифицирующие течение заболевания препараты способны существенно улучшать выживаемость и показатели моторного развития больных СМА, особенно при раннем начале терапии. Вследствие этого потребность пациентов в

длительном и непрерывном лекарственном обеспечении рисдипламом носит объективный и постоянный характер. Вместе с тем, доступ к нему в значительной степени ограничивается внешними и экономическими факторами: рисдиплам, как и многие другие орфанные препараты, отличается экстремально высокой стоимостью, в настоящее время не производится в Российской Федерации по полному циклу и в условиях санкционных ограничений в любой момент может стать недоступен для российских пациентов. Отдельно следует подчеркнуть уязвимость популяции взрослых пациентов со СМА, для которых получение терапии зачастую затруднено, так как программы лекарственного обеспечения пациентов с орфанными заболеваниями ориентированы преимущественно на детей.

Для Российской Федерации данная проблема приобретает стратегическое значение в контексте задач по обретению лекарственной независимости и развития полного производственного цикла, включая синтез фармацевтических субстанций. В данных условиях приоритетным направлением лекарственного обеспечения больных со СМА представляется именно рисдиплам: как пероральный низкомолекулярный модификатор сплайсинга *SMN2* он сочетает в себе доказанную эффективность в широком возрастном диапазоне при различных фенотипах СМА с благоприятным профилем безопасности, а как малая органическая молекула обладает существенно более высокой технологической реализуемостью локализации производства по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами и геннотерапевтическими препаратами. При этом рисдиплам представляет интерес не только как клинически значимый препарат, но и как объект внимания органической и медицинской химии: его структура включает несколько привилегированных и труднодоступных гетероциклических мотивов, широко применяемых в дизайне биологически активных соединений, а многокомпонентная сборка и длительная эволюция синтетических маршрутов демонстрируют повышенный интерес среди многих научных групп по всему миру. Следовательно, разработка собственной эффективной технологии получения рисдиплама и его ключевых структурных блоков на основе доступного сырья является чрезвычайно

перспективной и актуальной задачей не только с точки зрения осуществления полного импортозамещения ценного орфанного препарата для обеспечения независимости и медицинского благополучия страны, но и с точки зрения развития рациональных путей синтеза малых молекул.

1.2 Химическая структура рисдиплама – источник ценных строительных блоков для нужд медицинской и органической химии

Как было упомянуто ранее, помимо своей исключительной клинической значимости, молекула рисдиплама наглядно демонстрирует, каким образом структурно сложные, полифункциональные гетероциклические фрагменты могут выступать в роли привилегированных каркасов в современной разработке лекарственных средств (Рисунок 4).

Например, ядро имидазо[1,2-*b*]пиридазина – показательный пример фармакологической универсальности: наиболее ярко это отражается в составе одобренного FDA мультикиназного ингибитора понатиниба (Iclusig®), применяемого для терапии хронического миелоидного лейкоза [54]. Однако потенциал применимости данного фрагмента распространяется и на ряд других классов препаратов, включая ингибиторы GSK-3β, способные проникать через гематоэнцефалический барьер [55], пероральные ингибиторы JH2-домена TYK2 для лечения аутоиммунных заболеваний [56], и различные соединения с антимикробными свойствами [57, 58].

Недавние исследования взаимосвязи структура-активность (SAR) подчёркивают возможности систематической оптимизации данного фрагмента за счёт рационального подбора вариантов замещения, что обеспечивает тонкую настройку активности, селективности и фармакокинетических характеристик целевых соединений [57].

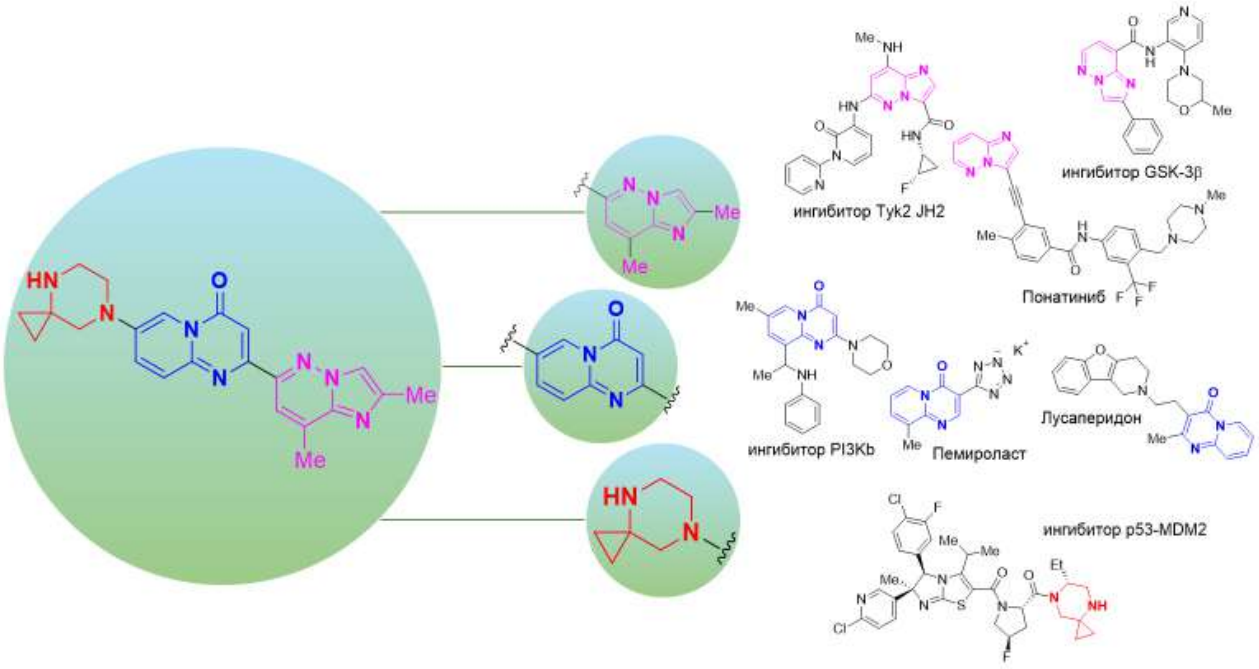


Рисунок 4 – Схематическое представление трёх структурных дескрипторов в молекуле рисдиплама – фиолетовый: имидазо[1,2-*b*]пиридазин; синий: пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он; красный: 4,7-диазаспиро[2.5]октан; примеры лекарственных препаратов и биологически активных низкомолекулярных соединений, содержащих указанные фрагменты

Бициклический остов 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она, в свою очередь, относится к числу наиболее фармацевтически успешных гетероциклических каркасов и лежит в основе многочисленных одобренных лекарственных препаратов, включая противоаллергическое средство пемироласт [59] и антидепрессант лусаперидон [60]. Данный каркас по-прежнему привлекает значительный интерес со стороны специалистов в области медицинской и органической химии, а направления его применения охватывают разработку ингибиторов альдозоредуктазы [61], ингибиторов PI3K в онкологии [62], а также антагонистов CXCR3 для терапии воспаления [63]. Синтетическая доступность данного каркаса, обеспечиваемая широким спектром методологических подходов, наряду с благоприятными лекарственно-подобными свойствами, определяет его ценность в качестве строительного блока для фармацевтической разработки [64].

Наконец, фрагмент 4,7-диазаспиро[2.5]октана отражает возрастающее признание спироциклических систем как привилегированных строительных блоков в дизайне лекарственных средств [65]. Хотя данный структурный тип изучен в меньшей степени по сравнению с другими спироциклическими каркасами, родственные диазаспиро-системы уже продемонстрировали свою пригодность в медицинской химии [66], включая разработку перспективных ингибиторов p53-MDM2 зависимых путей [67]. Спироциклические каркасы в целом обладают рядом существенных преимуществ, включая трёхмерность структуры, увеличение доли sp^3-гибридизованных центров и конформационную жёсткость. Последнее свойство способно понижать уровень энтропийных потерь при взаимодействии с рецептором для фармакологически активных веществ, содержащих этот элемент структуры молекулы [68]. Данные возможности были дополнительно расширены благодаря недавним достижениям в разработке новых методологий спироциклизации, основанных на снятии циклического напряжения, что улучшило доступ к разнообразным диазаспиро-каркасам и обеспечило их интеграцию в библиотеки веществ для скрининга и программ оптимизации лидерных соединений [69]. Широкое и успешное использование указанных гетероциклических каркасов в направленном конструировании фармакологически активных соединений с заданным типом биологической активности однозначно подтверждает, что рисдиплам является не только прорывным терапевтическим агентом, но и квинтэссенцией привилегированных структурных мотивов для будущих исследований в области поиска новых лекарственных средств.

Отдельного внимания заслуживает и синтетическая эволюция сборки самого рисдиплама, которая представляет собой показательную модель современного развития фармацевтических процессов и охватывает более чем десятилетний период инноваций – от первоначального открытия через промышленную оптимизацию до актуальных академических усовершенствований. Оригинальная схема получения молекулы рисдиплама, отраженная в патентах и публикуемых сведениях о технологических процессах компании F. Hoffmann-La Roche Ltd., представлена как многостадийный процесс, предусматривающий использование

реакций кросс-сочетания (в частности – реакции Сузуки) для сборки ключевых гетероциклических фрагментов (Рисунок 5) [39, 70]. Рассматриваемый подход был достаточно эффективен на этапе поиска молекулы-лидера и получения ранних клинических серий, однако имел ряд недостатков, а именно:

- предусматривал множественные трудоемкие стадии очистки;
- включал процессы, характеризующиеся невысокой региоселективностью и низкими выходами целевых веществ;
- характеризовался наличием опасных высокотемпературных превращений, которые в совокупности сформировали ограничения его масштабируемости.

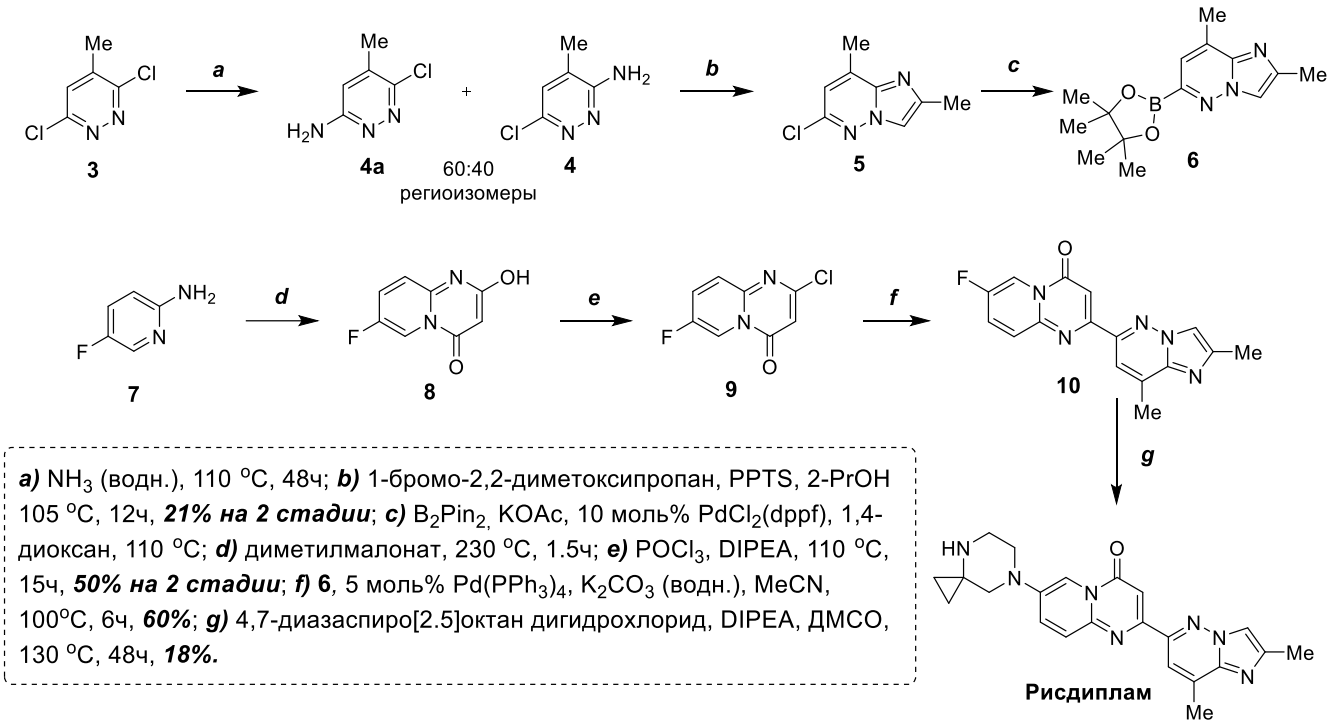


Рисунок 5 – Первоначальный синтетический маршрут получения рисдиплама

Указанные трудности в первую очередь обусловлены низкой региоселективностью реакции аминирования 3,6-дихлор-4-метилпиридазина **3**, а также реакции замещения атома фтора в производном **10** на заключительной стадии синтеза (замещение в положении N-4 конкурирует с замещением в положении N-7 и сопровождается образованием небольшого количества продукта N-4, N-7-дизамещения). Последующее затруднительное хроматографическое

разделение региоизомеров, а также высокотемпературная конденсация интермедиата **7** с диметилмалонатом в совокупности с выраженными окислительными свойствами ДМСО при повышенных температурах лишь вносили дополнительные осложнения в осуществление данной цепочки превращений.

Эволюция промышленного процесса заняла порядка десяти лет – с конца 2014 г. по начало 2024 г., – о чём свидетельствует расширившийся патентный ландшафт, включающий не только исходную интеллектуальную собственность компании-оригинатора, но и процессные инновации [71–75], которые будут рассмотрены подробнее далее. В указанный период также наблюдалось расширение патентного поля за счёт работ, направленных на исследование полиморфизма и оптимизацию лекарственных форм, что отражает комплексную стратегию защиты интеллектуальной собственности, характерную для коммерчески успешного фармацевтического продукта [76–79].

Сформировавшееся многообразие подходов привело к накоплению значительного массива научной литературы, включающего различные стратегические решения, новые интермедиаты и оригинальные методологии. Данный массив требует систематического анализа для выделения ключевых закономерностей, оценки тенденций эффективности и неэффективности синтеза и выявления новых, наиболее перспективных направлений будущего развития синтетических методологий для разработки собственных подходов к синтезу рисдиплама и его ключевых интермедиатов.

1.2.1 Достижения, ограничения и основные проблемы в синтезе рисдиплама. Подробный сравнительный обзор ключевых подходов к синтезу

Начиная с оригинального синтеза рисдиплама (Рисунок 5) [70], в литературе было описано достаточное количество синтетических маршрутов, ведущих к целевой молекуле или ключевым интермедиатам ее получения. Для комплексного анализа исследуемые маршруты целесообразно сгруппировать в три неравнозначных класса, различающихся как способами получения фрагментов, так

и алгоритмом сборки целевой молекулы. Чтобы облегчить навигацию, структурирование, визуализацию и анализ альтернативных схем сборки, каркас рисдиплама можно условно «разрезать» на три дескриптора, обозначенных буквами A–C (Рисунок 6).

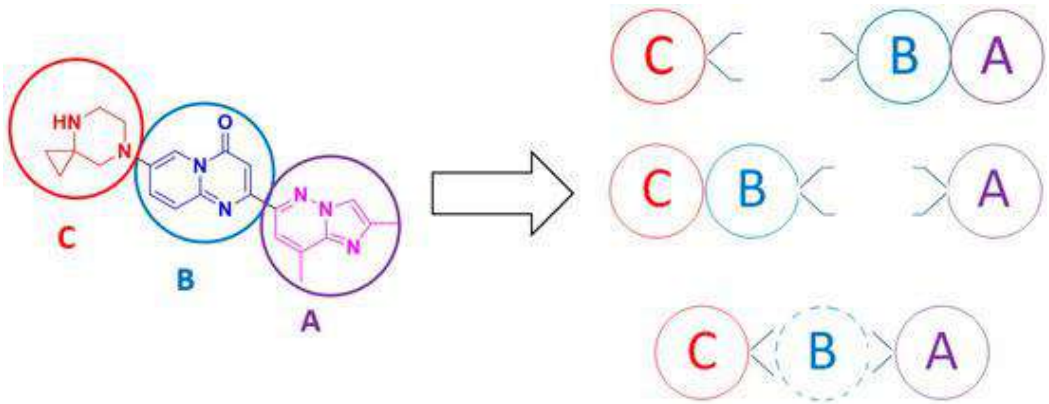


Рисунок 6 – Выделение трех основных дескрипторов и их схематическая вовлеченность в основные стратегии синтеза молекулы рисдиплама

Стратегии типа «C + BA» на пути к целевой молекуле

С ретросинтетической точки зрения большинство маршрутов данного типа на финальных стадиях опираются на замещение уходящей группы в положении C-7 в соединениях типа 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-галоген-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **11** фрагментом 4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-амина **12** (*N*-4-защищённым либо в виде свободного амина) (Рисунок 7) [3] по согласованному ($S_N2\delta^-$) или пошаговому механизму «нуклеофильного присоединения – отщепления» (A_N-E1cb). В зависимости от природы атома галогена, замещение по связи C–Hal может протекать каталитически (согласованный механизм, типичный для атомов Cl и Br) либо без катализатора (пошаговый механизм, типичный для атома F). Pd-катализируемые замещения атомов хлора и брома хорошо известны, распространены для родственных субстратов и охватывают широкий спектр условий и выходов [80–83]. Тем не менее, в синтезе рисдиплама они исторически применялись ограниченно, вероятно вследствие того, что большинство известных и детально описанных маршрутов

уже включали в себя дополнительные Pd-катализируемые стадии кросс-сочетания, поэтому замещения такого типа встречаются главным образом как единичные примеры в нескольких патентах [84, 85].

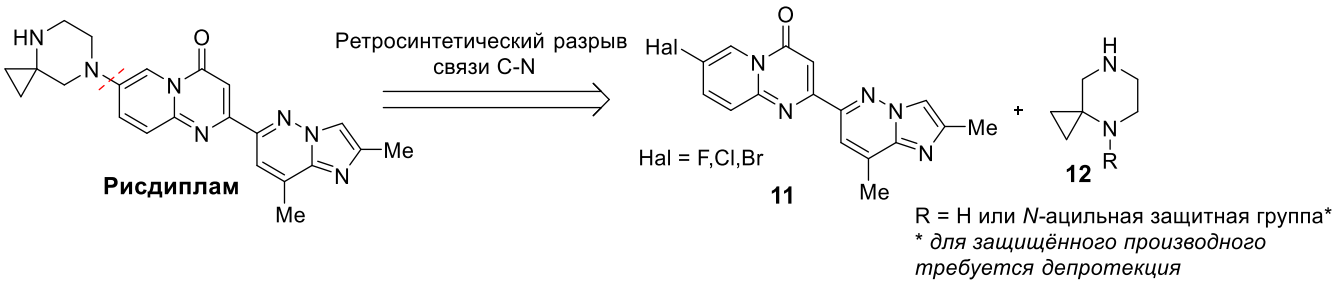


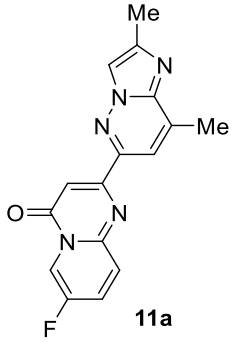
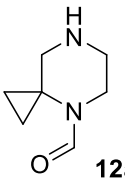
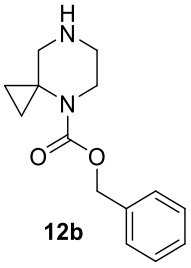
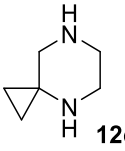
Рисунок 7 – Первая ретросинтетическая стадия в рамках стратегий синтеза рисдиплама типа «C + BA»

Напротив, некаталитическое замещение по связи C–F как для рисдиплама, так и для его биоизостерных аналогов было описано неоднократно. На ранних этапах разработки рисдиплама замещение атома фтора остатками циклических (в том числе – спироциклических) аминов первоначально осуществляли в высококипящих полярных апротонных растворителях: *N*,*N*-диметилацетамиде (ДМА) и *N*-метилпирролидин-2-оне [86, 87], затем – в диметилсульфоксиде (ДМСО) в присутствии K_2CO_3 либо триэтиламина (в качестве акцептора галогеноводорода) [70, 88], а после окончательного закрепления рисдиплама в качестве лидирующего соединения – в ДМСО в присутствии высокоосновного и малонуклеофильного *N*,*N*-диизопропил-*N*-этиламина (основание Хюнига) [39]. Примечательно, что в ходе последующей оптимизации заключительной стадии при использовании подобных подходов акцент сместился от подбора системы растворитель/основание к осознанному выбору защитной группы в молекуле нуклеофила **12**.

Следует также подчеркнуть, что амин **12** и его защищённые формы являются коммерчески широкодоступными. Это делает разработку маршрутов, исходящих из более простых предшественников данного фрагмента, коммерчески малопривлекательной и ресурсоёмкой. В рамках настоящей работы, интермедиат

12 и любые его производные рассматриваются как доступные молекулярные строительные блоки, либо как интермедиаты, получение которых из незащищенного/*N*-защищённого аналога не должно представлять существенных затруднений. В результате, различные варианты *N*-ацильной защиты спироамина **12**, среди которых формильная **12a** [89] и (бензилокси)карбонильная (Cbz) **12b** [74], обеспечивают более высокую хемо- и региоселективность по сравнению с использованием незащищенного свободного амина **12c** [39] и, как правило, повышают выход выделенного продукта замещения (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение условий реакции замещения и выходов при использовании различных защитных групп на фрагменте 4,7-диазаспиро[2.5]октана по сравнению с незащищённым аналогом

Субстрат	**Заместитель**	**Условия реакции**	**Выход (%)**	**Условия депротекции**	**Ссылка**
 **11a**	 **12a**	K_2CO_3, ДМСО 120-160 °C, 24 ч	50	HCl (к.) / AcOH, 80–100 °C	[89]
	 **12b**	Основание Хюнига, ДМСО 130 °C, 48 ч	47	BCl_3, $CHCl_3$/ДХМ −10 °C - 30 °C, 13 ч	[74]
	 **12c**	Основание Хюнига, ДМСО 130 °C, 48 ч	18	Не требуется	[39]

При сопоставимых выходах реакций замещения с использованием вышеупомянутых защитных групп, технологически более привлекательным представляется применение *трет*-бутоксикарбонильной (Boc) группы благодаря

сравнительно мягким условиям её удаления и возможности непосредственного выделения рисдиплама в виде соответствующей соли. Вместе с тем в ряде рассмотренных подходов предпочтение было отдано другим защитным группам, что свидетельствует о возможности дальнейшей оптимизации данной стадии.

Вместе с тем очевидно, что ключевым этапом на пути к целевой молекуле является эффективный и масштабируемый синтез ключевого интермедиата **11**. Как правило, его получение осуществляют путем Pd-катализируемого кросс-сочетания между фрагментом 7-галоген-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **13**, содержащим хорошую уходящую группу в положении C-2, и 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-бороновой кислотой **14** (или её пинаколовым эфиром **6**) (Рисунок 8).

В отличие от разнообразия методик терминальной стадии замещения, сочетание фрагментов **13** и **6** (или **13** и **14**) с образованием **11** по литературным данным сравнительно унифицировано и характеризуется ограниченным методологическим разнообразием. Ключевым этапом на пути реализации данного процесса является активация положения C-2 в ядре 7-галоген-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **13** посредством реакций дезоксихлорирования либо *O*-сульфонилирования (Рисунок 8). С этой целью для 7-фторпроизводных обычно используют оксихлорид фосфора ($POCl_3$) в присутствии основания Хюнига [39, 70, 74, 86, 88, 90–92]. Также сообщается об эффективности чистого $POCl_3$ или системы ПФК/$POCl_3$, в особенности для 7-бром- и 7-хлороаналогов [93–96].

В случае необходимости введения более «сильного» нуклеофуга применяют подходы *O*-тозилирования (с использованием системы $TsCl/Et_3N$ в хлористом метилене) либо *O*-трифлирования (с использованием $PhNTf_2$/NaH) [75, 90]. Получаемый интермедиат **13a** либо **13b/13c** далее вступает в типичную реакцию Сузуки-Мияуры с борорганическим соединением **6/14** в присутствии $Pd(PPh_3)_4$ и водного K_2CO_3 в ацетонитриле при 100 °C, что обычно приводит к целевому продукту с выходом около 60% [39, 74, 75].

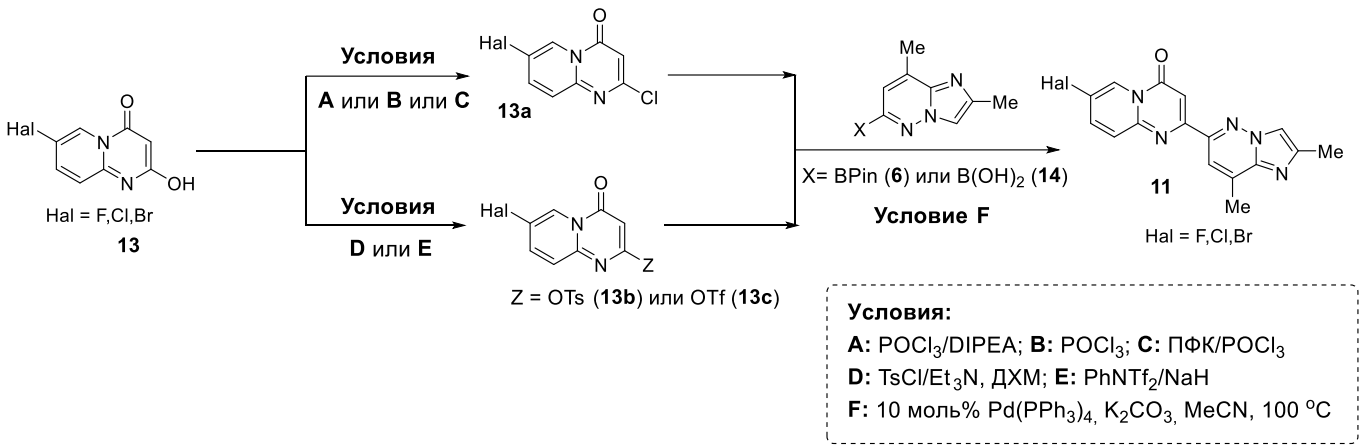


Рисунок 8 – Стандартные подходы к активации положения С-2 в ядре 7-гало-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **13** и условия получения ключевого интермедиата **11**

Несмотря на то, что заключительные стадии сборки молекулы рисдиплама включают в себя технологически сложные операции, основная химическая сложность сосредоточена в получении блоков **13** и **6/14**, обеспечивающих описанные выше превращения. Синтез предшественника 7-галоген-2-гидрокси-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **13** может быть реализован с использованием известных вариаций реакции Конрада-Лимпаха: либо посредством термической конденсации 2-амино-5-галогенпиридинов с диалкилмалонатами при повышенных температурах [70, 86, 88, 90, 97], либо их взаимодействием с малонилдихлоридом [98, 99] или *бис*-(2,4,6-трихлорфенил)малонатом в мягких условиях [99, 100].

Хотя малонилдихлорид, благодаря высокой реакционной способности, позволяет проводить трансформацию в наиболее мягких условиях [98, 99], его гидролитическая нестабильность и выраженная коррозионная активность делают использование данного реагента технологически сложным. Напротив, *бис*-(2,4,6-трихлорфенил)малонат представляет собой удобную альтернативу названному хлорангидриду, сочетая сопоставимую мягкость условий и близкие выходы [100, 101] при более высокой стабильности и меньшей коррозийности. Более того, наличие 2,4,6-трихлорфенокси-фрагмента (выступающего эффективным нуклеофугом) играет ключевую роль в механизме присоединения-отщепления, обеспечивая протекание реакции с хорошим выходом. Напротив,

привлекательность более дешёвых диалкилмалонатов (диметил- [86, 88], диэтил- [97] и ди-*трет*-бутил- [102]) существенно снижается, поскольку их применение требует жёстких условий из-за низкой склонности метокси-, этокси- и особенно *трет*-бутокси-групп к анионоидному отщеплению. Более того, применимость ди-*трет*-бутилмалоната дополнительно вызывает значительные сомнения: объёмные *трет*-бутильные заместители одновременно создают как положительный индуктивный эффект, так и выраженное стерическое экранирование вблизи карбонильного атома углерода, существенно затрудняя его нуклеофильную атаку. Показательно, что единственный задокументированный пример использования ди-*трет*-бутилмалоната приведён именно в патенте компании-оригинатора, посвящённом синтезу рисдиплама, что резко контрастирует с многочисленными работами, демонстрирующими эффективность более реакционноспособных аналогов.

Имидазо[1,2-*b*]пиридазиновый фрагмент **6/14** (второй необходимый блок для осуществления кросс-сочетания), в свою очередь, представляет еще более сложную синтетическую задачу вследствие ограниченной коммерческой доступности и нетривиального характера замещения. Даже при условии, что первые две ретросинтетические стадии (Рисунок 9) выглядят достаточно предсказуемыми, они допускают множество вариантов практической реализации. Как правило, бороновую кислоту **14** (или её пинаколовый эфир **6**) получают практически количественно, без дополнительной очистки, посредством классического борилирования по Мияуре соответствующего 6-хлор-2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазина **5** с использованием *бис*-(пинаколато)дибора (B_2Pin_2).

Наиболее распространёнными катализаторами/лигандными системами в данном случае являются: $PdCl_2$(dppf) [39, 70, 74, 102–105], XPhos–[Pd] [106], а также $Pd(OAc)_2$ в сочетании с PCy_3 [75]. Прямое получение свободной бороновой кислоты, в свою очередь, реализуют как с использованием $PdCl_2$(dppf), так и системы $Pd_2(dba)_3$/XPhos [107–112].

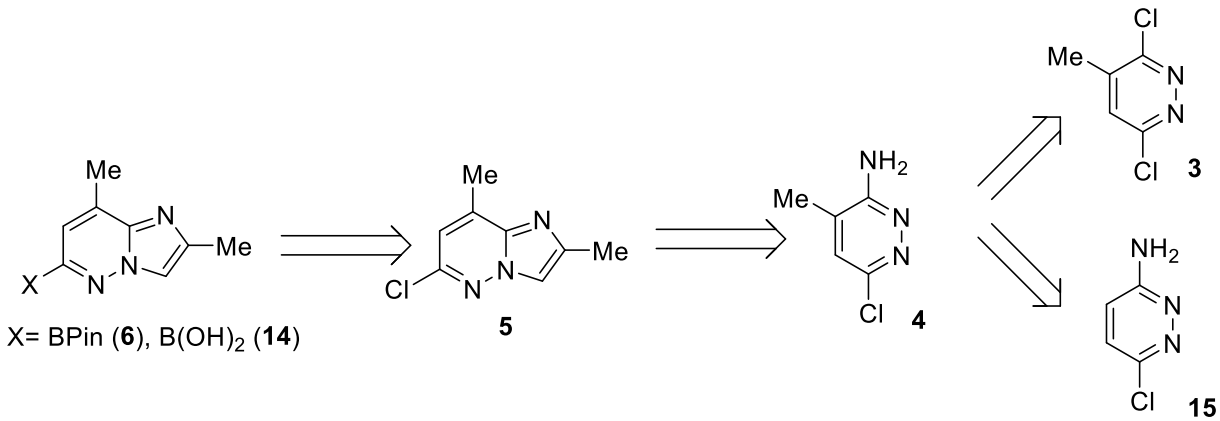


Рисунок 9 – Ретросинтетический анализ ключевого строительного блока на основе имидазо[1,2-*b*]пиридазинового фрагмента

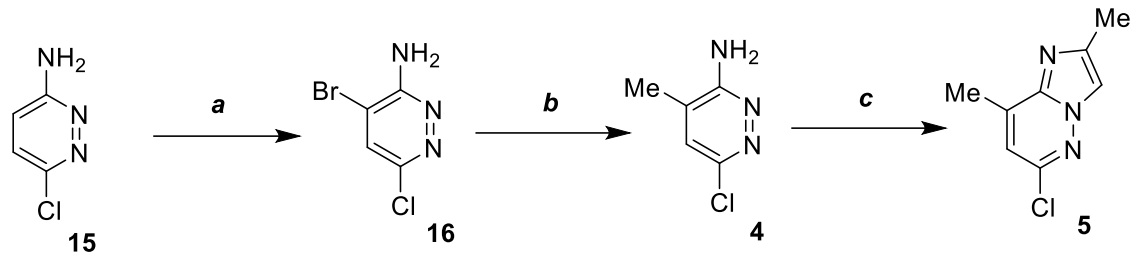
Однако, независимо от способов получения боронового производного, неизменным исходным соединением для всех синтезов остаётся соединение **5**. Это вещество давно известно [113] и рассматривается как важный молекулярный строительный блок для синтеза гербицидов [114] и различных фармакологически активных соединений. Наиболее известные способы его получения основаны на использовании 3-амино-4-метил-6-хлорпиридазина **4**, который вводится в реакцию гетероциклизации с бром- или хлорацетоном, либо с полученным *in situ* 2-метоксиаллилбромидом [39, 107, 112, 113, 115, 116]. Следует отметить, что практически во всех опубликованных синтетических маршрутах к рисдипламу именно пиридазин **4** является своеобразным «бутылочным горлышком».

Фундаментальной причиной этого является низкая региоселективность замещения атома хлора в 3,6-дихлор-4-метилпиридазине **3**, что приводит к образованию смеси региоизомеров, а также следов продукта двойного замещения. При этом целевой региоизомер является минорным ввиду экранирования соответствующего атома хлора метильной группой, находящейся при соседнем атоме углерода. Ранее протокол реакции подразумевал получение продукта **4** взаимодействием **3** со спиртовым раствором аммиака, с последующим выделением целевого изомера методом колоночной хроматографии. Ряд современных подходов используют водный аммиак [39, 103, 117], однако такой метод сопровождается образованием продуктов гидролиза, вследствие чего выделение целевого

соединения становится возможным также исключительно с применением хроматографических техник. С учётом относительно жёстких условий, длительного времени проведения реакции, полной зависимости от хроматографических методов очистки и кожно-нарывного и сенситизирующего действия исходного вещества **3,** существовала необходимость разработки принципиально иной стратегии получения данного строительного блока.

Для обеспечения воспроизводимого, не требующего трудоемкой хроматографической очистки доступа к пиридазину **4**, сотрудники F. Hoffmann-La Roche Ltd. в рамках кампании по оптимизации синтетического маршрута предложили альтернативную стратегию, которая в итоге была принята для формирования финальной версии коммерческого синтеза рисдиплама. Основная идея заключалась в инверсии порядка введения заместителей в ядро коммерчески доступного 3-амино-6-хлорпиридазина **15**, который использовался в качестве исходного соединения [75]. Такой подход должен был обеспечивать точный регионтроль за счёт последовательной функционализации исходного соединения (Рисунок 10).

Первые попытки бромирования соединения **15** элементарным бромом приводили к выходам порядка 40% и сопровождались известными технологическими сложностями. Систематическое сравнение альтернативных бромирующих агентов позволило идентифицировать 1,3-дибром-5,5-диметилгидантоин (DBDMH) как реагент выбора. Использование последнего в буферной системе NaOAc/AcOH (3:1) в метаноле с последующей обработкой Na_2SO_3 и кристаллизацией обеспечивало получение соединения **16** в виде единственного региоизомера с выходом 70% и чистотой >99% в микротоннажном масштабе [75].



a: DBDMH (0.6 экв.), NaOAc (0.75 экв.), AcOH (0.25 экв.), MeOH, 30°C, ***70%;***
b: 1) MeMgCl (1.05 экв.), $ZnCl_2$ (0.5 экв.), ТГФ, 25°C; 2) $Pd(OAc)_2$ (1 моль%) PPh_3 (4 моль %); 3) MeMgCl (1.65 экв.), 3ч, 50°C, 4) KH_2PO_4 (0.03 экв.), ***75%;***
c: хлорацетон (1.5 экв.), NaBr, DIPEA, 2-PrOH, *i*-PrOAc, ***59%***

Рисунок 10 – Оптимизированная технологическая схема получения ключевого интермедиата **5**

Последующее метилирование через кросс-сочетание по Негиши оказалось одновременно инновационным и технологически весьма трудоёмким мероприятием. Первоначальные попытки применения пирофорного диметилцинка были признаны неприемлемыми для промышленной наработки. Окончательное решение проблемы заключалось в получении искомого цинкорганического реактива *in situ* из доступного $ZnCl_2$ и метилмагнийхлорида (добавляемого двумя порциями): первая порция (1.05 экв.) предназначалась для контроля выделения метана, а вторая (1.65 экв.) – для запуска стадии метилирования. Тщательный температурный контроль (50°C) и оптимизация соотношения Pd/лиганд (1:4) для минимизации диметилирования (<1%) обеспечивали получение соединения **4** с высоким выходом. Добавление K_2HPO_4 было необходимо для осаждения остаточных солей цинка и палладия, которые отфильтровывали непосредственно перед кристаллизацией чистого продукта из системы MeOH/H_2O. Финальную циклизацию, как отмечалось выше, проводили в одной из доступных редакций, с использованием хлорацетона в присутствии основания Хюнига при 80 °C (бромид натрия при этом выступал в роли промотора реакции). После двойной кристаллизации из системы *i*-PrOAc/2-PrOH/*н*-гептан ключевой интермедиат **5** был получен с чистотой >99.8% и выходом 59% в пересчете на соединение **4** [75]. Таким

образом, удалось трансформировать низкоэффективный первоначальный синтетический маршрут в масштабируемый производственный процесс.

Тем не менее, даже несмотря на представленные достижения в получении интермедиата **5**, разработанный коммерческий процесс сохраняет ряд недостатков, осложняющих его техническую реализацию. Со всех точек зрения нестандартный модифицированный вариант реакции Негиши, являющийся ключевым этапом схемы синтеза, сопряжен с критическими проблемами, включая жёсткие требования к контролю выделения метана, необходимости практически полного удаления следовых количеств палладия и управление побочными продуктами диметилирования. В сочетании с умеренным суммарным выходом (~31%), разработка эффективного и безопасного подхода к получению данного интермедиата, по-прежнему является актуальной задачей [3].

Хотя независимое получение ключевых строительных блоков придаёт стратегии конвергентные черты, финальная сборка молекулы рисдиплама по стратегии «C + BA» (Рисунок 6), по сути, осуществляется линейно, что открывает дополнительные возможности для структурной диверсификации при дизайне родственных терапевтических соединений. Модульность данного подхода позволяет целенаправленно модифицировать отдельные гетероциклические компоненты, формируя универсальную платформу для разработки аналогов и исследования зависимостей типа «структура-активность» для этих веществ.

«CB + A» и конвергентные «C + A» (с образованием «B» в ходе реакции) подходы к синтезу рисдиплама

Более современные подходы к синтезу рисдиплама всё чаще опираются на конвергентные схемы, что иллюстрируется как оптимизированным коммерческим процессом компании-оригинатора, так и недавними разработками, существенно расширившими синтетическую доступность целевого соединения. Помимо ранее описанной стратегии «C + BA»-сборки конечной молекулы, описан и запатентован ряд конвергентных подходов к синтезу рисдиплама, в которых важными интермедиатами являются производные 5-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)пиридин-2-амина **23** (Рисунок 11). В большинстве описанных случаев они

содержат защищённую имино-группу [73, 102, 118], но известен также единичный пример использования вещества **23** и в свободной форме [119].

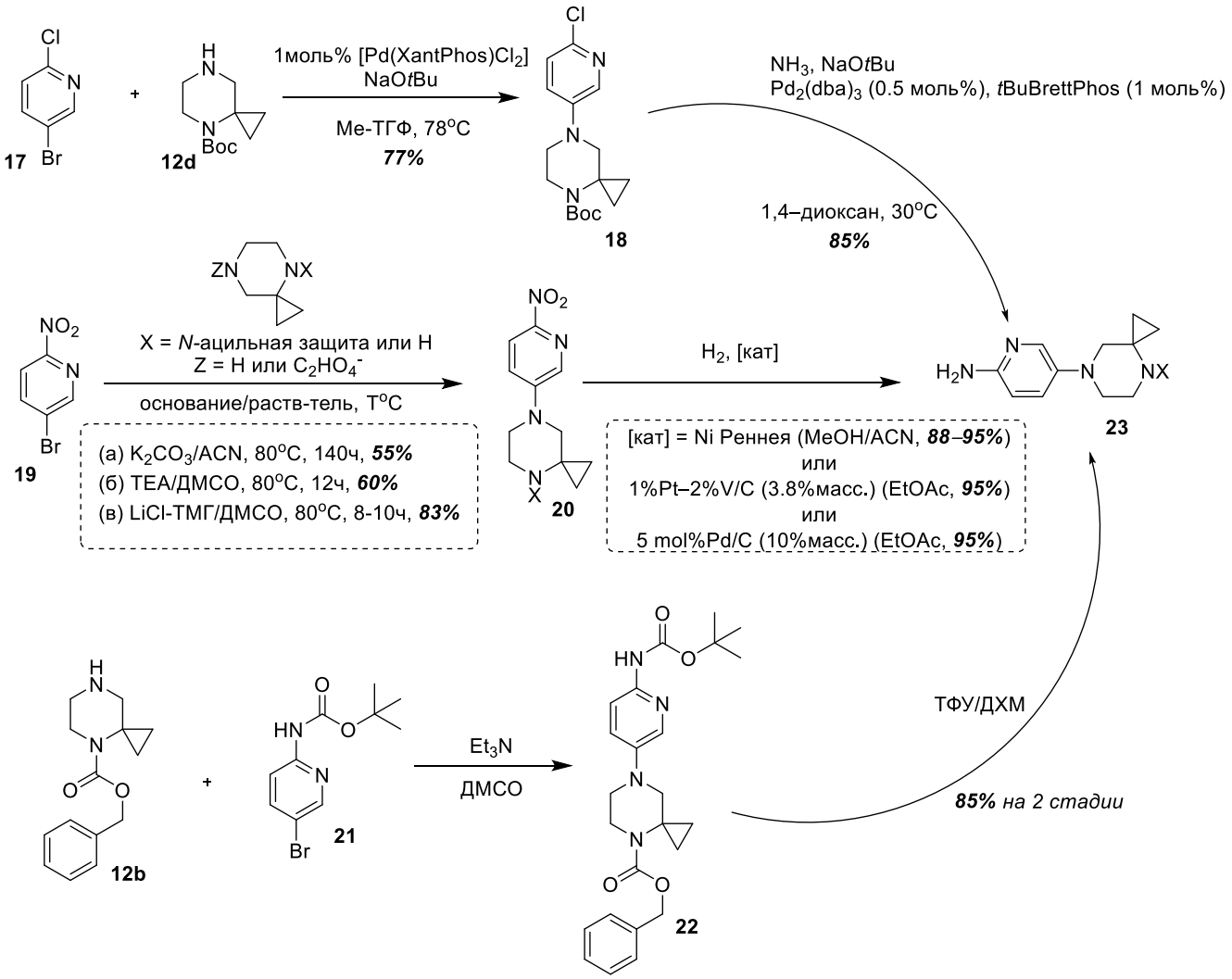


Рисунок 11 – Три наиболее распространенных синтетических подхода к получению ключевого интермедиата **23**

Соединение **23** может быть получено по известному двухстадийному протоколу. На первой стадии осуществляют нуклеофильное ароматическое замещение атома брома в 5-бром-2-нитропиридине **19** соответствующим спироциклическим амином с образованием производного 2-нитропиридина **20** в свободной либо *N*-ациллированной форме. В большинстве случаев для осуществления данного перехода используют Boc-защищённую форму спироциклического амина [72, 120, 121]. Применимость свободного 4,7-

диазаспиро[2.5]октана [122], в свою очередь, представляется сомнительной из-за проблем региоселективности, связанных с возможным гетарилированием двух неэквивалентных атомов азота в структуре спироциклического амина. В конечном итоге, реакцию проводят с использованием в качестве растворителей ДМСО [102, 122, 123] или ацетонитрила [73] в сочетании с триэтиламином [120], карбонатом калия [73, 122] либо системой «хлорид лития – тетраметилгуанидин» [75, 102, 121] в качестве основания, что приводит к получению интермедиата **20** (Рисунок 11). Полученное нитросоединение **20** затем подвергают каталитическому гидрированию (в присутствии никеля Реннея [122], платины [73] или палладиевого катализатора [118, 123]) с образованием ключевого интермедиата **23**.

В литературе также встречаются два подхода, позволяющих получить аналогичный интермедиат в обход использования 5-бром-2-нитропиридина. Один из них основан на Pd-катализируемом аминодегалогенировании 5-бром-2-хлорпиридина **17** Boc-защищённым спироамином **12d** с последующим каталитическим замещением атома хлора на аминогруппу [75, 102] (Рисунок 11).

Как вариант, Cbz-защищённый интермедиат может быть получен прямым взаимодействием *трет*-бутил-*N*-(5-бромпиридин-2-ил)карбамата **21** с *N*-Cbz-защищённым спироамином **12b** с последующим кислотным снятием Boc-защиты [124]. Однако этот протокол также выглядит сомнительным из-за отсутствия ориентанта второго рода в *пара*-положении относительно атома брома, что делает субстрат существенно менее реакционноспособным в некаталитических процессах нуклеофильного замещения.

Далее, независимо от выбранного пути синтеза, ключевой интермедиат **23** либо вводят в модифицированный синтез по Конраду-Лимпаху с использованием *бис*-(2,4,6-трихлорфенил)малоната [121, 122] или ди-*трет*-бутилмалоната [102], либо подвергают модифицированной гетероциклизации Гульда-Джекобса. В первом случае образуется *N*-защищённый 7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-гидрокси-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он **24**, представляющий собой ценный молекулярный строительный блок для дальнейшего получения рисдиплама. Затем проводят рассмотренное выше *O*-тозилирование [102, 121] либо

дезоксихлорирование [122] с последующей Pd-катализируемой реакцией кросс-сочетания. В результате получается *N*-защищённая форма рисдиплама, депротекция которого в результате приводит к получению целевого соединения (Рисунок 12).

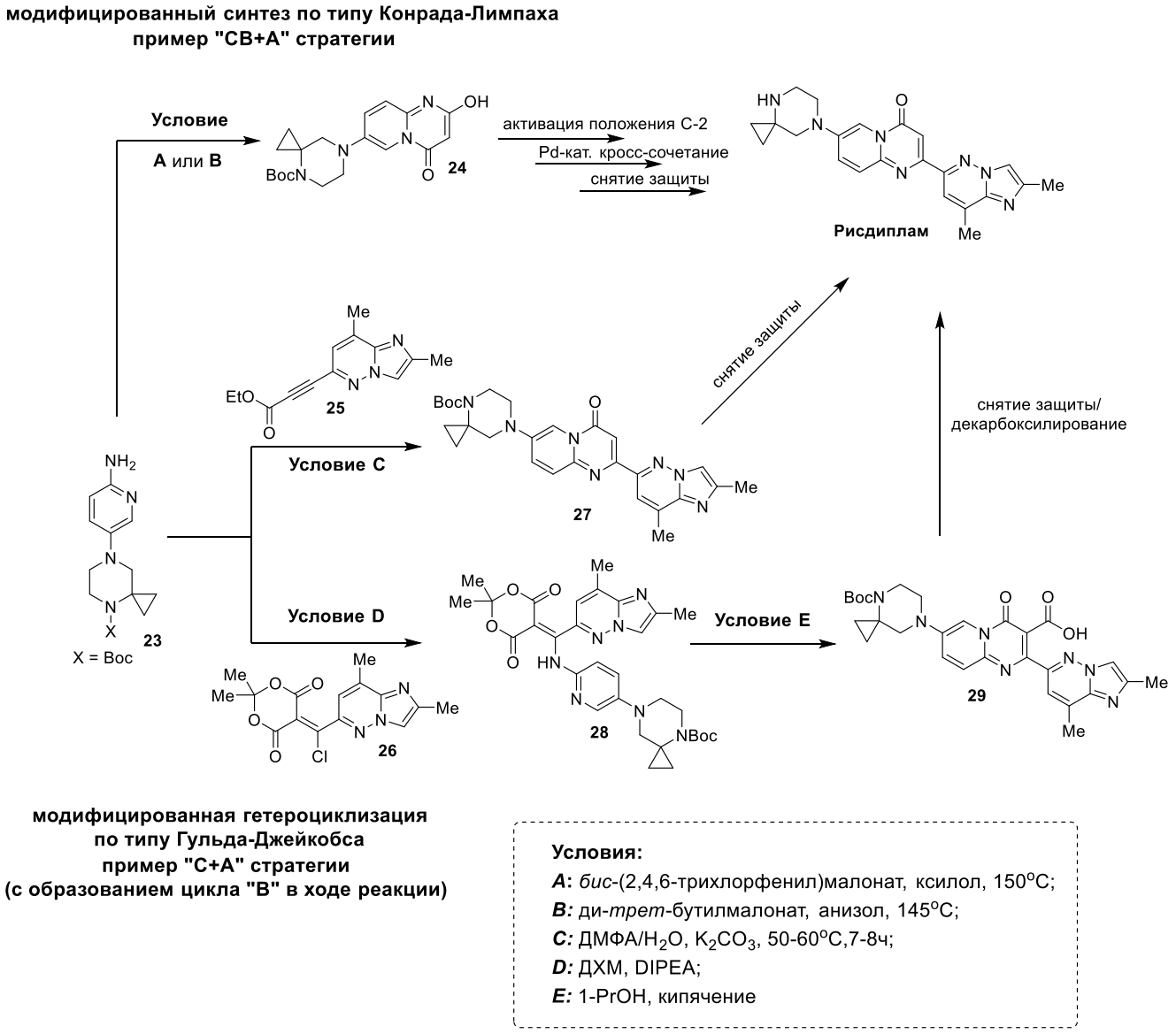


Рисунок 12 – Две основные конвергентные стратегии синтеза рисдиплама на основе ключевого интермедиата **23**

Модифицированная реакция Гульда-Джекобса, в свою очередь, основана на взаимодействии того же ключевого интермедиата **23** с этиловым эфиром 3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пропиоловой кислоты **25** [72, 119, 125]

либо с его синтетическим эквивалентом **26** (получаемым *in situ* из соответствующей ацилированной кислоты Мельдрума и реагента Вильсмейера-Хаака) [73]. При этом, в первом случае после снятия защитной группы, получается искомый рисдиплам [119]. В альтернативном прочтении данной схемы образуется *N*-защищённая карбоксилированная форма рисдиплама **29** [73] (Рисунок 12). Последняя может быть превращена в целевое соединение при кипячении в кислой среде, необходимой для одновременного снятия защитной группы и декарбоксилирования.

Основным недостатком указанных путей является низкая стабильность как производного пропиоловой кислоты **25**, так и интермедиата **26**. Более того, соединение **25** склонно к олиго- и полимеризации вследствие сочетания в одной молекуле оснóвного атома азота и активированной ацетиленовой связи. Интермедиат **26**, в свою очередь, содержит высокореакционноспособный атом хлора, способный вступать в различные реакции нецелевого замещения. Кроме этого, согласно литературным данным, гетероциклизация между производными типа **25** и свободными 2-аминопиридинами не протекает вследствие сравнительно низкой основности и нуклеофильности последних [126]. Для осуществления гетероциклизации необходимо использовать анионную форму соответствующего *N*-(пиридин-2-ил)формамида с последующим снятием защитной группы *in situ* [126]. В качестве альтернативы, в случае свободной формы 2-аминопиридина, предлагается использование катализатора – трифлата серебра, выступающего как сильная апротонная кислота Льюиса, способного промотировать данную реакцию [127]. Наконец, по некоторым данным, использование этиленгликоля в качестве растворителя также может способствовать протеканию данной реакции [128]. Однако, ни один из указанных способов не предусматривался в оригинальной методике, таким образом, указанные противоречия ставят под сомнение реализуемость синтетических последовательностей, представленных в соответствующем объекте интеллектуальной собственности. Более того, получение представленных интермедиатов, также, как и многих других в рамках синтеза рисдиплама, осложнено очередными Pd-зависимыми процессами. Так, для

синтеза соединения **25**, имидазо[1,2-*b*]пиридазин **5** вводят в очередную реакцию кросс-сочетания с этилпропиолатом [72], а получение соединения **26**, в свою очередь, завершается Pd-катализируемым карбонилированием того же интермедиата **5** с выделением соответствующей 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты [72]. В итоге, отправной точкой для синтеза обоих интермедиатов, как и некоторых ранее описанных других, остаётся одно и то же вещество – труднодоступный 6-хлор-2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин **5**, а суммарная перегруженность подходов дорогими палладий-зависимыми синтетическими переходами ставит под вопрос и технологичность, и экономичность процессов.

В результате, систематический анализ синтетических методологий получения рисдиплама и его ключевых интермедиатов выявил следующие закономерности: отдельные опубликованные синтетические новшества, в частности использующие незамещённые спироциклические амины, нестабильные или малореакционноспособные производные, вызывают серьёзные вопросы с точки зрения реализуемости и масштабируемости. Вместе с тем, оптимизированный коммерческий процесс компании-оригинатора, хоть и представляет собой эталон промышленной разработки, эффективно устранивший проблемы региоселективности, характерные для более ранних маршрутов, все еще обладает целым рядом выявленных недостатков. Исключительная опора на каскады реакций кросс-сочетания, с различной степенью синтетической сложности, использование дорогостоящих катализаторов, трудно поддающихся регенерации, токсичных хлорорганических растворителей, относящихся к стойким загрязнителям окружающей среды, и необходимость жёсткого контроля образования метана в ходе технологических процессов, а также сравнительно невысокий суммарный выход (31%) ключевого интермедиата **5** и образование значительных объёмов неорганических отходов делают получение рисдиплама нетривиальной задачей.

Зависимость известных маршрутов от труднодоступного сырья и дорогостоящих каталитических систем создает идеальные предпосылки для

разработки оригинальных, практичных и экономически эффективных способов синтеза рисдиплама и ключевых интермедиатов его получения. Перспективные подходы, основанные на использовании доступных исходных соединений, призваны полностью исключить применение реакций кросс-сочетания, катализируемых комплексами драгоценных металлов, а также хроматографических методов очистки. Это может существенно упростить технологические процессы, повысить общую эффективность и позволить преодолеть все описанные выше ограничения.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведённый анализ литературных данных показал, что, несмотря на большое число предложенных подходов к синтезу рисдиплама и его ключевых интермедиатов, задача разработки технологичных, воспроизводимых и практически реализуемых маршрутов его получения по-прежнему остаётся актуальной. В основе большинства известных синтетических решений лежат маршруты, восходящие к оригинальным разработкам компании F. Hoffmann-La Roche Ltd. и сохраняющие зависимость от каскадов палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания, дорогостоящих каталитических систем и технологически чувствительных стадий. Предложенные позднее модификации отдельных стадий, хотя и расширяют формальное разнообразие синтетических подходов, во многих случаях не устраняют этих ограничений в полной мере, а иногда вызывают обоснованные сомнения с точки зрения воспроизводимости и перспектив масштабирования. Таким образом, совокупность рассмотренных данных указывает на необходимость разработки новых рациональных путей синтеза рисдиплама и его ключевых интермедиатов, ориентированных прежде всего на использование доступного исходного сырья, снижение технологической сложности процесса и создание предпосылок для существенного снижения себестоимости за счёт полного отказа от палладий-катализируемых стадий кросс-сочетания.

Среди описанных в литературе подходов наибольший интерес с точки зрения дальнейшего развития синтетической стратегии представляет маршрут, основанный на использовании продуктов ацилирования кислоты Мельдрума (Рисунок 12, молекулы **26** и **28**). Несмотря на существенные технологические ограничения данного решения и мотивированный отказ компании-оригинатора от его дальнейшего развития [75], заложенная в нём синтетическая логика представляется перспективной для поиска альтернативных путей получения рисдиплама. Более того, сохранение общего принципа построения целевой молекулы при пересмотре отдельных стадий позволяет не только развить

предложенную ранее стратегию, с целью разработки собственной технологии получения рисдиплама в масштабе нескольких килограммов, но и наметить близкие по синтетической логике альтернативные направления.

2.1 Новые ретросинтетические идеи. Выделение ключевого интермедиата

Следует отметить, что подходы, основанные на использовании производных кислоты Мельдрума, не являются единственным направлением, в рамках которого производные имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты могут рассматриваться в качестве исходных соединений для построения молекулы рисдиплама без использования палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания. Действительно, при глубоком анализе способов построения центрального ядра 7-галоген-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **11**, нами было предложено альтернативное ретросинтетическое расчленение по связи C-4/N-5 (Рисунок 13) в структуре целевого гетероцикла с выделением соответствующего енаминоэфира **30** в качестве стабильного и синтетически доступного интермедиата, получение которого возможно, например, за счет прямой циклоконденсации этил-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-3-оксопропаноата **31** с соответствующим производным 2-аминопиридина. Такой подход позволил бы сформировать важный интермедиат **11** за минимальное количество стадий с использованием синтетических подходов, призванных упростить общую последовательность.

Однако, практическая реализация обоих маршрутов невозможна без получения ключевого интермедиата, который позволял бы в рамках указанных стратегий в одну стадию выходить к «стартовым» блокам завершающих этапов синтеза. Для обеих стратегий (Рисунок 14) таким интермедиатом может быть ядро 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазина **32**, содержащее в положении C-6 фрагмент сложного эфира и представляющее собой общего предшественника соответствующих кислоты **33** и кетоэфира **31**.

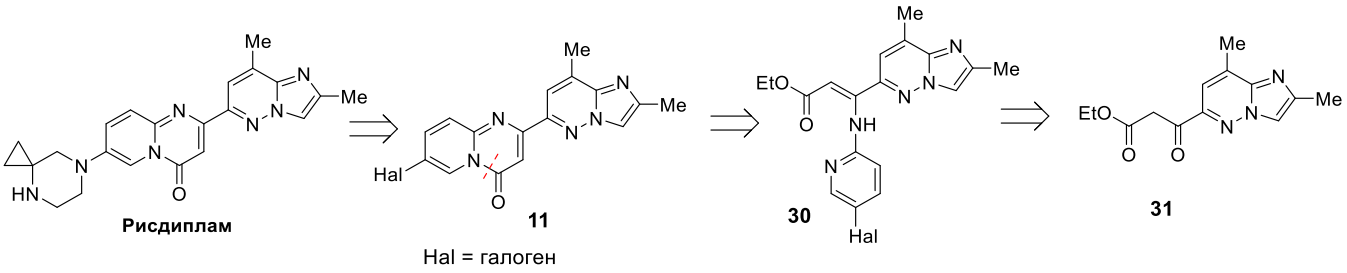


Рисунок 13 – Ретросинтетический анализ рисдиплама, основанный на разрыве связи C-4/N-5 (красная пунктирная линия) в ядре 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она

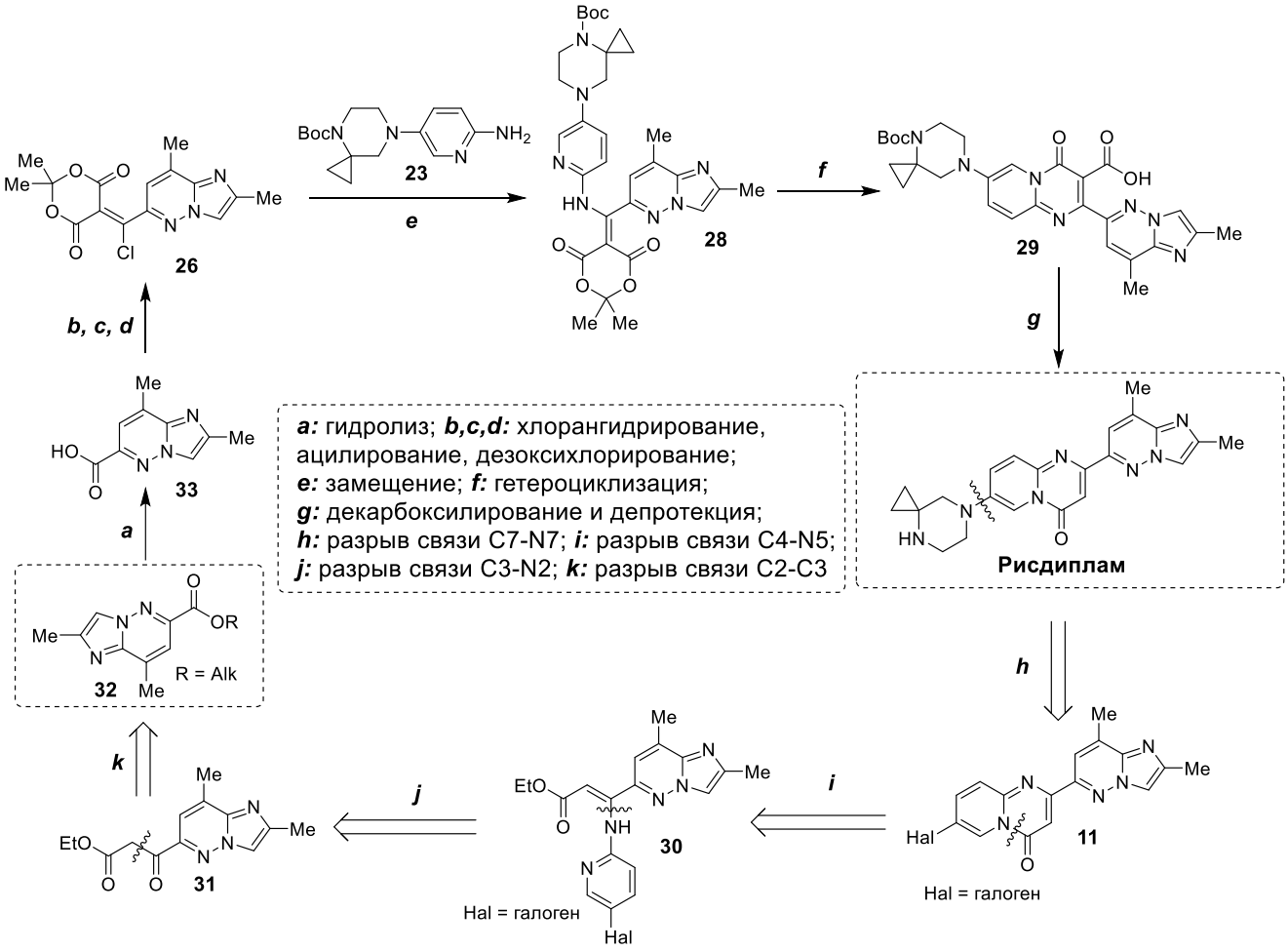


Рисунок 14 – Предлагаемые пути к рисдипламу с использованием сложных эфиров 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты в качестве ключевых интермедиатов

Следовательно, именно доступность блока **32** определяет реализуемость всей дальнейшей синтетической последовательности. Вещества данного хемотипа не были ранее описаны в открытых источниках и недоступны в продаже. В этой связи,

разработка рационального, экономически целесообразного способа его получения становится критической.

2.2 Разработка и оптимизация синтеза сложных эфиров 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты

Анализ литературных данных показал, что введение карбоксильной функции в положение С-6 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазина ранее осуществлялось исключительно посредством Pd-катализируемого карбонилирования соответствующего хлорпроизводного **5** (Рисунок 15).

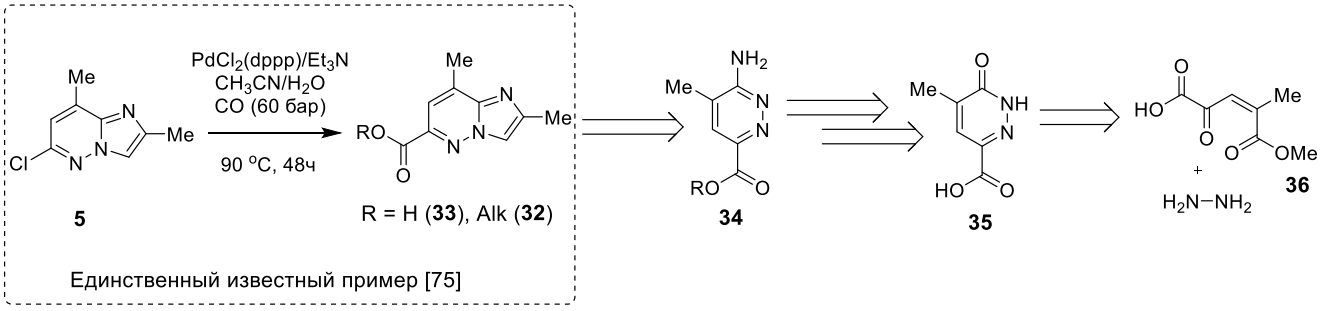


Рисунок 15 – Основная ретросинтетическая линия получения ключевого эфира **32** через интермедиат **35**

Такой подход не мог быть принят в рамках настоящей работы, поскольку, помимо очередного использования палладиевых каталитических систем в сочетании с очень высокими значениями избыточного давления, он предусматривал предварительное получение 6-хлор-2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазина **5**, ранее определенного нами как наиболее технологически сложный и труднодоступный прекурсор. По этой причине необходимость появления карбоксильной функции в указанном положении следовало осуществить как можно раньше и проще. При этом, непосредственно формирование имидазо[1,2-*b*]пиридазинового фрагмента заданного строения описано достаточно подробно и может быть реализовано путём гетероциклизации соответствующего амина **34** с известными и доступными бромацетоном или хлорацетоном, либо с 2-

метоксиаллилбромидом, генерируемым *in situ*. Совокупность этих соображений позволила выделить очередное важное промежуточное соединение – 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновую кислоту **35** (Рисунок 15), дезоксиаминирование положения С-6 которой фактически открывало путь к целевому эфиру **32**.

Кислота **35**, в свою очередь, также является коммерчески недоступной, с единственным упоминанием в литературе в середине 1950-х годов, в рамках малоэффективного синтетического подхода, основанного на окислении соответствующего дигидропиридазонового предшественника в кипящей ледяной уксусной кислоте [129]. Последующее рациональное ретросинтетическое расчленение молекулы **35** показало, что искомая кислота потенциально может быть получена гетероциклизацией моноэфира 2-метил-4-оксопент-2-ендиовой кислоты **36** с гидразином. Ещё более примечательно, что синтез самого этого эфира **36**, представляющего собой, по существу, продукт кротоновой конденсации метилпирувата, был впервые описан лишь в 2020 году [130] и до этого времени не имел разработанной препаративной методики получения, несмотря на длительную историю изучения химии пирувата. Соответствующая синтетическая стратегия потенциально обеспечивала возможность раннего введения карбоксильной функции, полного исключения Pd-катализируемых стадий и выхода к совершенно новому синтетическому решению, за счет полного отсутствия альтернативных разработок в данном направлении.

2.2.1 Трехстадийный процесс на основе кротоновой конденсации метилпирувата, снимающий вопрос синтетической недоступности 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты

Первоначальная экспериментальная оценка реализуемости выбранного синтетического подхода [130] позволила качественно подтвердить, что исследуемая реакция конденсации действительно протекает (Рисунок 16). Об этом свидетельствовало, в частности, характерное изменение окраски реакционной

смеси от бесцветной к оранжево-красной через промежуточную ярко-жёлтую стадию. Вместе с тем, продукт конденсации метилпирувата в действительности представляет собой смесь близких по строению соединений, в результате чего регистрируемые ЯМР-спектры содержат трудноинтерпретируемую совокупность перекрывающихся сигналов и не позволяют надёжно судить ни о качественном, ни о количественном составе продукта конденсации. С учётом этого, для оценки эффективности конденсации был выбран иной подход, основанный на фиксации изолированного выхода продукта последующей стадии **38**. Такой способ оценки позволял одновременно судить как о качестве протекания стадии конденсации, так и о её практической применимости.

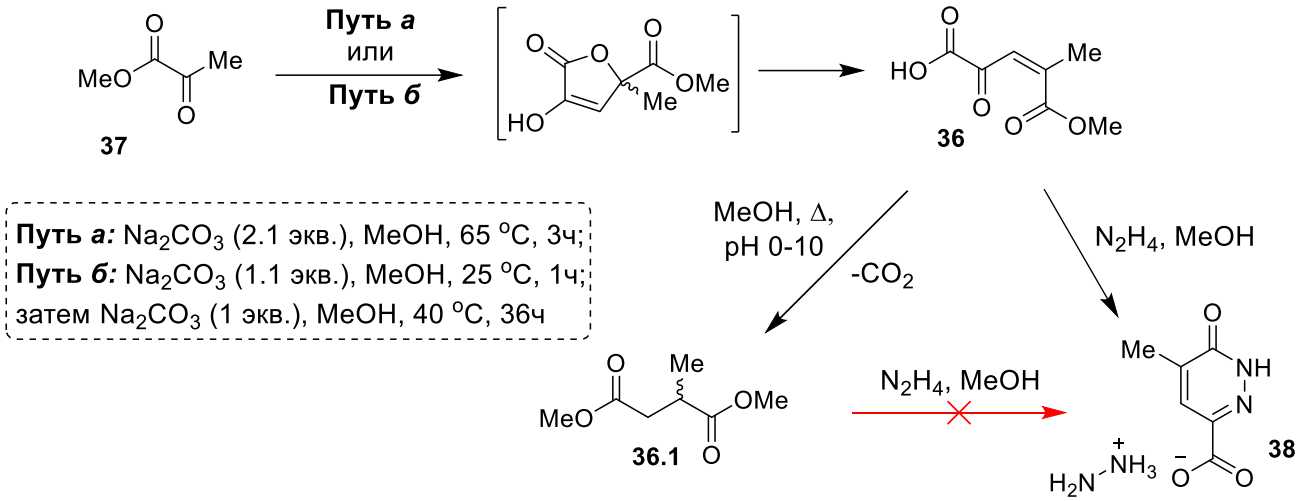


Рисунок 16 – Единственный известный способ получения интермедиата **36** [130] и предложенный на его основе способ получения целевой соли **38**

Воспроизведение литературных условий реакции кротоновой конденсации метилпирувата **37** по пути «а» и «б», с последующей гетероциклизацией полученного полупродукта **36** гидразином (Рисунок 16), обеспечило выход продукта **38** на уровне 18.0% и 5.6% соответственно (Таблица 2). Поскольку гетероциклизация соединения **36** с участием гидразина носила выраженный экзотермический характер, а продукт практически мгновенно выпадал в осадок из метанола, что обеспечивало не только полноту протекания реакции, но и легкое

выделение и очистку продукта, – такой сравнительно низкий выход суммарного процесса мог быть обусловлен, в частности, образованием значительных количеств нежелательной примеси **36.1**, которая очевидно не приводит к образованию соли **38** при конденсации с гидразином. При этом, по словам авторов, примесь **36.1** образуется за счет декарбоксилирования соединения **36** при продолжительном нагревании реакционной смеси в метаноле в достаточно широком диапазоне pH [130], что контрастирует с описанными условиями процессов «а» и «б» и ставит под сомнение высокие значения выходов этих стадий.

Таблица 2 – Исследование влияния количеств метанола и условий реакции в процессе кротоновой конденсации метилпирувата на выход продукта **38**

№	Объем метанола / 1 г метилпирувата	Температурные условия	Время выдержки	Выход **38**, %
Путь а	55 мл	кипение	3 ч	18,0
Путь б	55 мл	25 °C → 40 °C	1 ч → 36 ч	5,6
1	15 мл	60 °C	3 ч	13,5
2	15 мл	40 °C → 60 °C	1 ч → 3 ч	17,6
3	25 мл	40 °C → 60 °C	1 ч → 3 ч	25,8
4	**30 мл**	**40 °C → 60 °C**	**1 ч → 3 ч**	**29,9**
5	35 мл	40 °C → 60 °C	1 ч → 3 ч	21,0
6	40 мл	40 °C → 60 °C	1 ч → 3 ч	19,8

С целью подбора оптимальных условий проведения реакции конденсации метилпирувата был выполнен сравнительный анализ эффективности альтернативных оснований, выбранных из ряда: карбонат калия, карбонат цезия, ацетат натрия и ацетат калия. Ни одно из них не обеспечивало получения желаемого продукта. В связи с неэффективностью исследованных оснований, в методике был сохранён исходно описанный безводный карбонат натрия, несмотря

на его ограниченную растворимость в метаноле, а дальнейшую оптимизацию процесса сосредоточили на следующих параметрах:

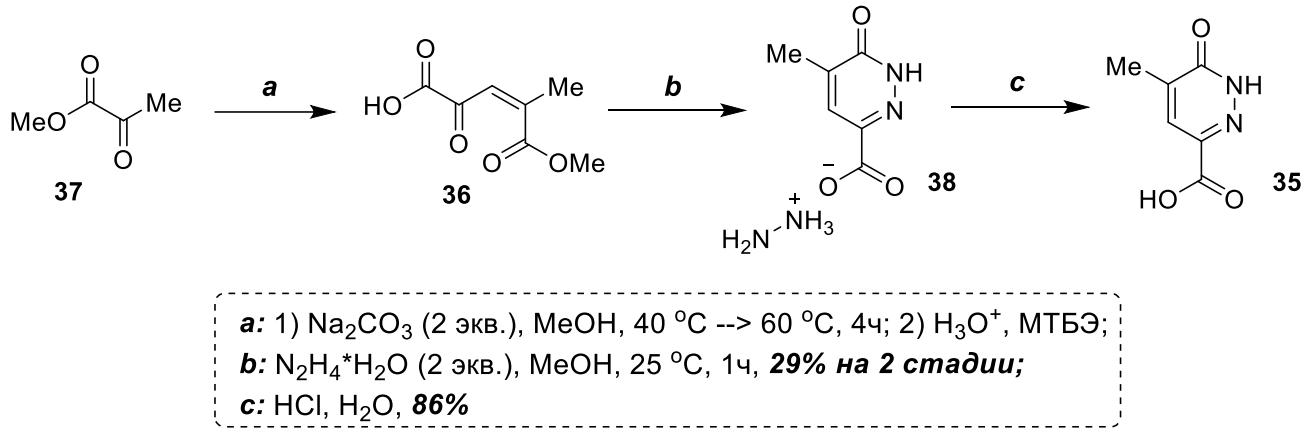
- варьировании объёма метанола, который в исходной методике использовали в большом избытке – 55 мл на 1 г исходного вещества;
- подборе температурных и временных условий конденсации метилпирувата, направленных на повышение выхода целевой гидразиниевой соли **38** (Таблица 2).

Первые эксперименты показали, что уменьшение объёма растворителя до 15 мл на 1 г исходного метилпирувата при проведении реакции при 60 °C приводит к снижению выхода соли **38** до 13,5%. Напротив, использование ступенчатого температурного режима при сопоставимой общей продолжительности процесса (по пути «а») позволяло сохранить значение выхода практически на исходном уровне (17.6%). В совокупности с результатами эксперимента по пути «б», продемонстрировавшего существенное снижение выхода при длительном нагревании реакционной смеси, полученные данные позволили зафиксировать температурный (40 → 60 °C) и временной (4 часа) режимы последующих экспериментов и сосредоточить дальнейшую оптимизацию на изменении количеств растворителя. Последовательное увеличение объёма MeOH привело к прохождению выраженного максимума выхода: наибольшее значение в 29.9% было достигнуто при использовании 30 мл MeOH на 1 г метилпирувата, тогда как дальнейшее увеличение объёма растворителя вновь сопровождалось снижением выхода. Таким образом, проведённые эксперименты позволили определить наиболее оптимальные параметры процесса для образования целевого продукта **38**.

Существенным практическим результатом также стало экспериментальное подтверждение низкой устойчивости полупродукта **36** в слабощелочной метанольной среде, и, как следствие, выделение критической точки процесса. Более того, было установлено, что простое выдерживание реакционной смеси в метаноле при комнатной температуре свыше 72 часов вызывает практически

полное разрушение продукта конденсации и, как следствие, исключает возможность последующей гетероциклизации.

В результате, несмотря на умеренный общий выход и описанные технологические тонкости, разработанная нами методика обладает рядом существенных достоинств. Среди их числа следует выделить следующие: технологическую простоту и высокую скорость процесса, хорошую кристаллизуемость целевого продукта, возможность эффективной рекуперации растворителей, образование преимущественно неорганических отходов, а также использование доступных и исключительно дешёвых исходных веществ. Перечисленные «бонусы» полностью нивелируют относительно скромный выход и расширяют границы масштабируемости синтеза соединения **35** до килограммовых масштабов (Рисунок 17).



a: 1) Na_2CO_3 (2 экв.), MeOH, 40 °C --> 60 °C, 4ч; 2) H_3O^+, МТБЭ;
b: N_2H_4*H_2O (2 экв.), MeOH, 25 °C, 1ч, ***29% на 2 стадии;***
c: HCl, H_2O, ***86%***

Рисунок 17 – Разработанный синтетический подход к интермедиату **35**

2.2.2 Поиск, преодоление ограничений и оптимизация путей синтеза при получении целевого фрагмента

При разработке дальнейших синтетических ветвей одной из ключевых задач являлось сохранение карбоксильной функции при одновременном осуществлении региоселективного введения аминогруппы в положение С-6. Не менее важным требованием оставалась технологическая реализуемость процесса, исключающая

необходимость хроматографического разделения возможных побочных продуктов. На раннем этапе предпринимались попытки получить амин **34** или его ближайшие производные наиболее короткими и быстрыми путями.

Так, одностадийная обработка исходной кислоты **35** смесью $POCl_3$ и PCl_5 приводила к образованию соответствующего хлорангидрида **35.1** (Рисунок 18). Без дополнительной очистки он был использован в серии экспериментов, где, однако, основным продуктом в случае использования раствора аммиака в ТГФ оказывался исключительно амид **35.2**, тогда как целевой продукт замещения **35.3** фиксировался лишь в следовых количествах. Альтернативное получение **35.2** при пониженной температуре не позволило продвинуться по цепочке, поскольку попытки превратить его в соответствующий нитрил **35.4** в присутствии хлорокиси фосфора оказались безуспешными, а действие раствора аммиака в ДМСО при нагревании приводило к осмолению реакционной смеси (по данным ВЭЖХ-УФ-МС в ней присутствовали лишь следовые количества целевого амида **35.3**).

Неудачными оказались и попытки обойти стадию образования амида. Прямая обработка исходного хлорангидрида **35.1** метанольным раствором аммиака с последующим кипячением приводила лишь к образованию смеси хлор- и метоксиэфиров. Независимое получение сложного эфира **35.7** и его последующее аминирование по положению С-6, также не дало удовлетворительного результата, приводя лишь к образованию трудноразделимой смеси продуктов.

Таким образом, прямые подходы к получению производных амина **34** либо его ближайших аналогов оказались неэффективными. Это заставило отказаться от прямого аминирования и предложить альтернативную стратегию. Она подразумевала опосредованное введение аминогруппы в положение С-6, через модификацию альтернативной азотной функции. В качестве последней была выбрана азидо-группа. Такой выбор связан с высокой нуклеофильностью азид-аниона и его способностью эффективно вступать в реакции замещения.

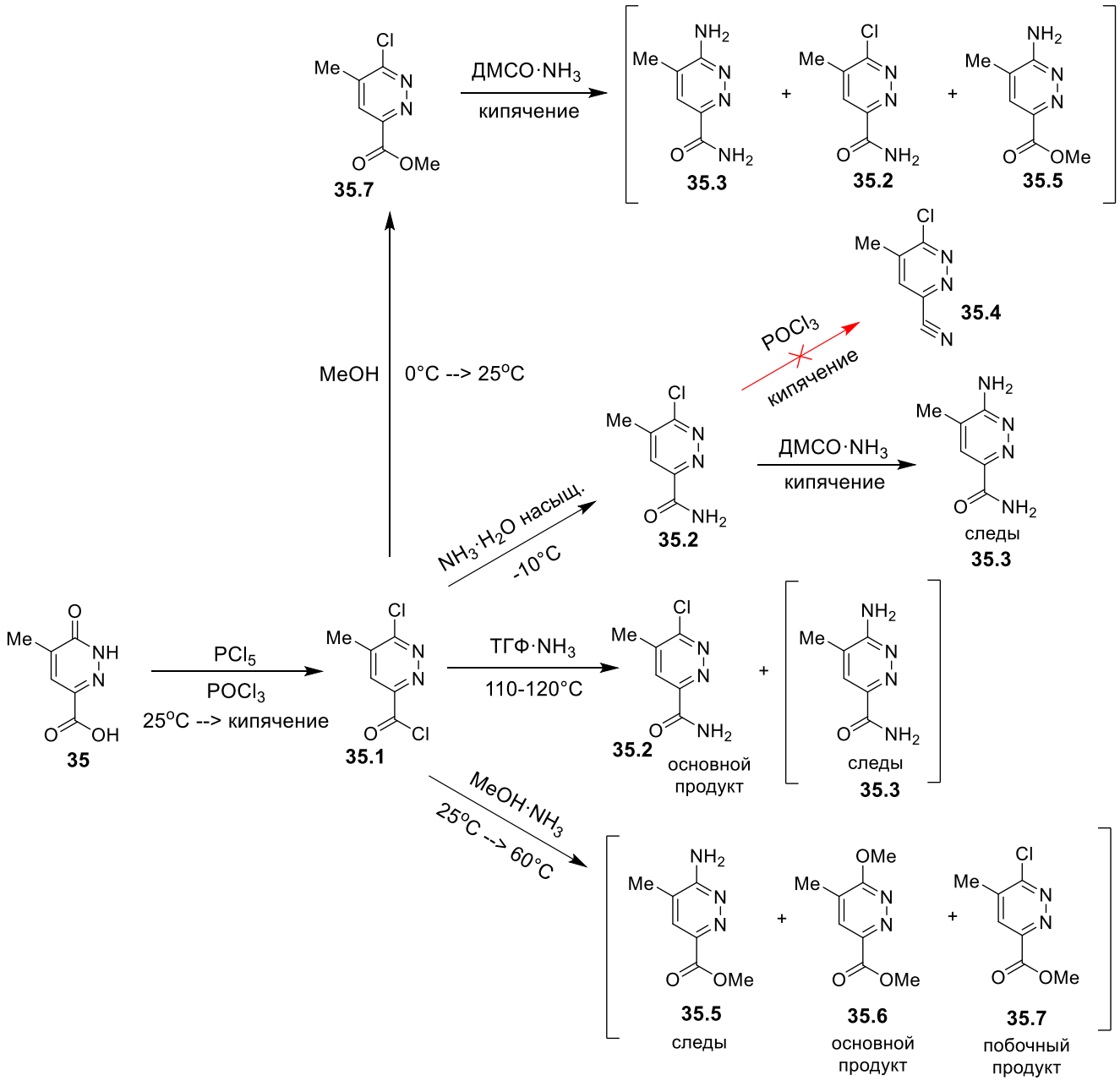


Рисунок 18 – Исследование подходов к дезоксиаминированию положения С-6 в молекуле вещества **35**

Также известно, что под влиянием различных восстановителей, которые не затрагивают фрагмент сложного эфира, можно с хорошим выходом переводить органические азиды в соответствующие первичные амины. Иными словами, целевое соединение было решено получать через восстановление соответствующего этил-6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоксилата **41**.

Первоначальным интермедиатом выбора для получения вещества **41** стал этил-6-(тозилокси)-5-метилпиридазин-3-карбоксилат **39.2** (Рисунок 19). Такой

выбор был связан с потенциальной возможностью *O*-тозилирования лактимной формы эфира **39** в относительно мягких, по сравнению с дезоксихлорированием условиях, а также ввиду того, что тозилокси-группа является лучшим нуклеофугом, по сравнению с атомом хлора. Кроме этого, такой подход мог позволить избежать выделения газообразного хлористого водорода, что немаловажно для разработки будущей технологии.

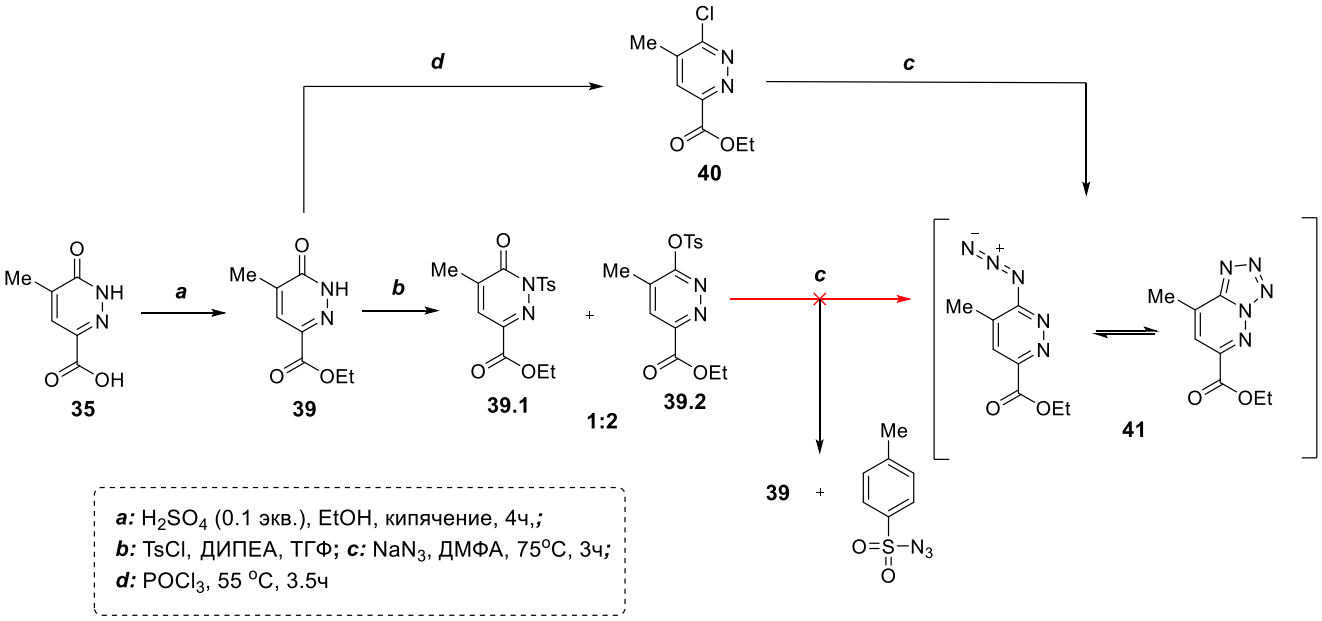


Рисунок 19 – Оригинальный способ получения азида **41**

К сожалению, и этот подход не принес желаемого результата. Помимо образования смеси изомерных *O*- и *N*-замещенных продуктов **39.2** и **39.1** в соотношении 2:1 соответственно, при обработке продуктов тозилирования азидом натрия было обратно выделено только исходное соединение **39** и зафиксировано образование тозилазида. Такое направление реакции можно считать следствием зарядового контроля в сочетании с пространственным экранированием атома углерода С-6 объемной тозилокси-группой и метильным радикалом в *орто*-положении к ней в случае *O*-тозилирования. Аналогично сказывается влияние зарядового контроля и при *N*-тозилировании лактамной формы сложного эфира.

В результате, успешный синтез соединения **41** удалось реализовать с помощью более тривиальной идеи замещения активированного атома галогена. Так, последовательное превращение кислоты **35** в соответствующий этиловый эфир **39**, выделенный с выходом 87%, и дальнейшая реакция дезоксихлорирования эфира под действием хлорокиси фосфора с выходом 88% позволили получить этил-6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоксилат **40**. Дальнейшее нуклеофильное замещение атома хлора в полученном интермедиате на азидогруппу приводило к образованию соединения **41** с выходом 92% (Рисунок 19).

Следует отметить, что для вещества **41** характерна азид-тетразольная таутомерия, которая может быть зарегистрирована с использованием ИК-спектроскопии, причем доминирующим, в данном случае, является тетразольный таутомер. Данный вывод следует из отсутствия характеристической полосы валентных колебаний азидо-группы в области 2100–2200 см$^{-1}$ (Рисунок 20).

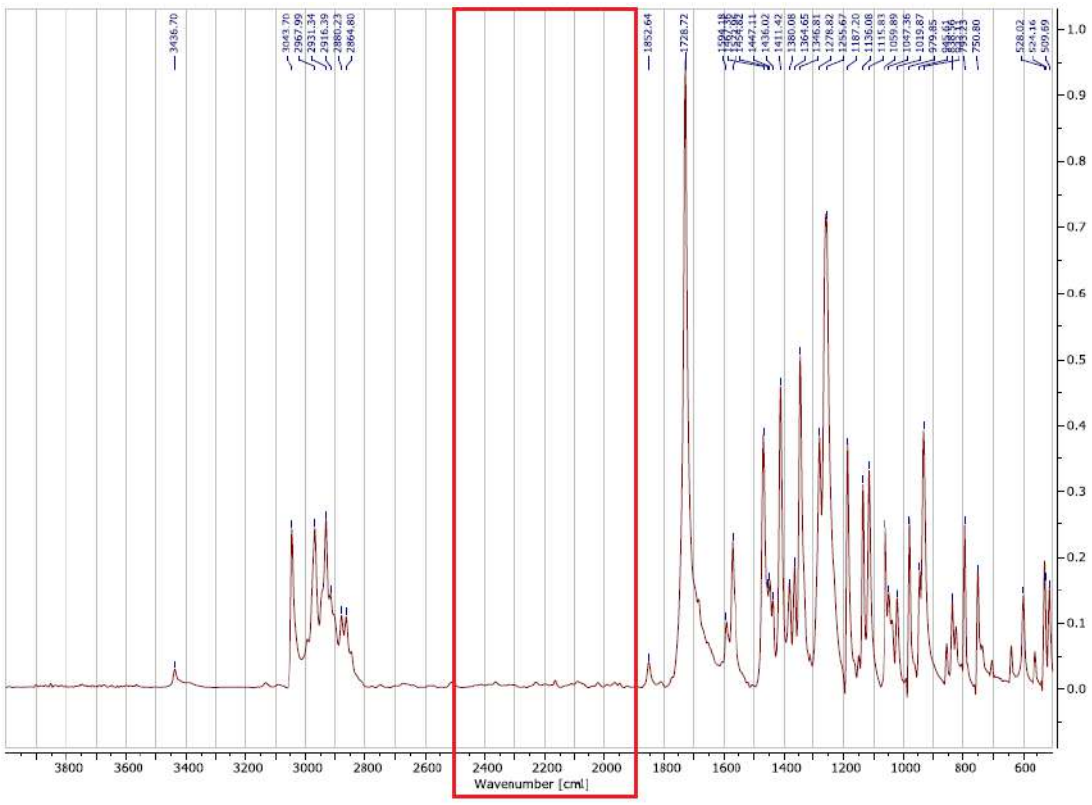


Рисунок 20 – ИК-спектр соединения **41** с отсутствующей характеристической полосой валентных колебаний азидо-группы

Несмотря на наличие большого числа классических подходов к восстановлению азидов, подобрать наиболее предпочтительный препаративный вариант оказалось нелегко. В частности, известный подход, основанный на реакции Штаудингера с последующим гидролизом иминофосфорана, при проведении синтеза в ледяной уксусной кислоте протекал лишь в условиях кипячения, что неизбежно сопровождалось образованием побочного этил-6-ацетамидо-5-метилпиридазин-3-карбоксилата **42.1** (вследствие реакции ацетилирования) в соотношении около 1:1 с целевым продуктом (Рисунок 21).

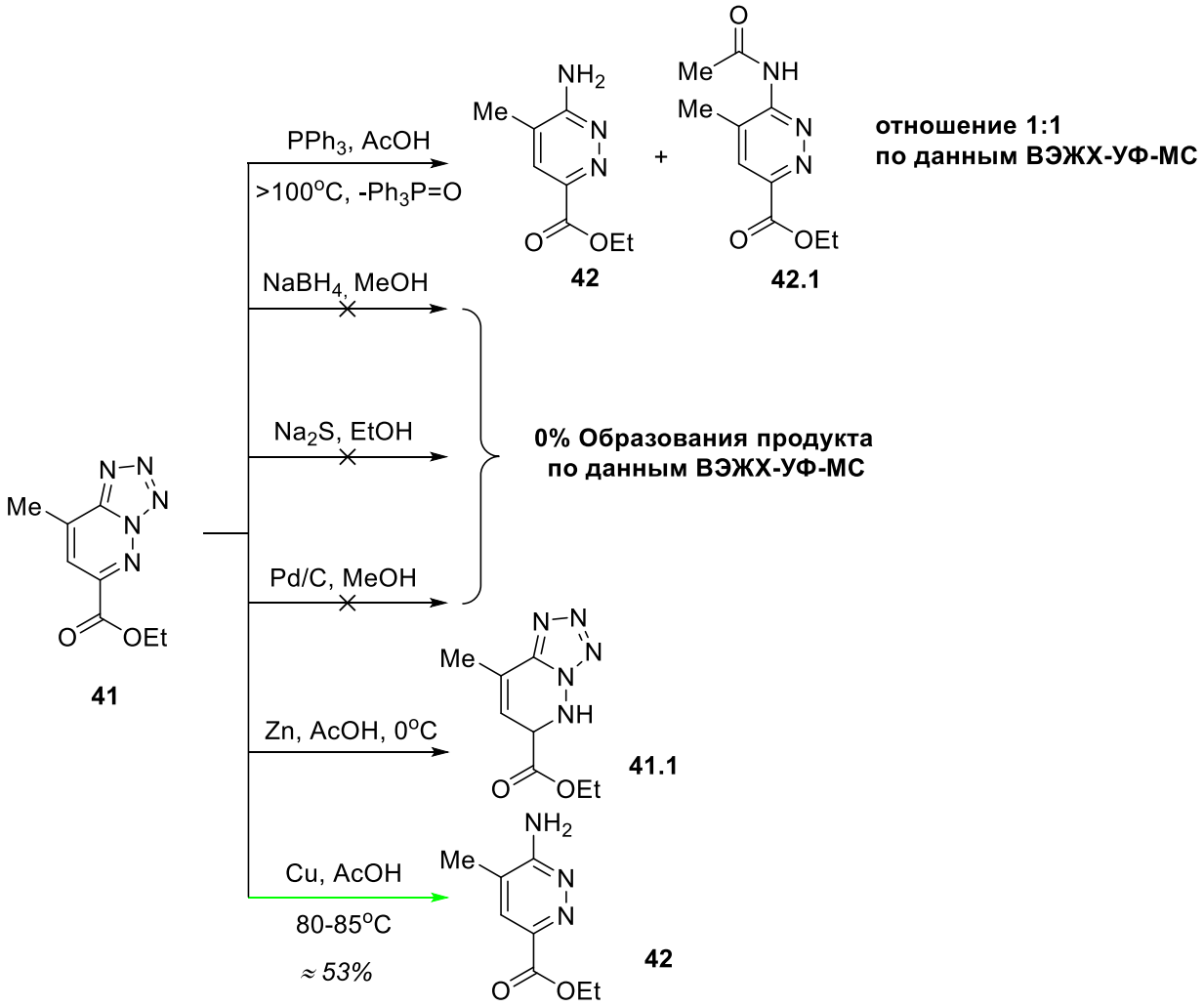


Рисунок 21 – Сравнительная оценка условий восстановления соединения **41**

Кроме этого, данный метод был дополнительно отягощён необходимостью использования токсичного трифенилфосфина и образованием в процессе реакции

известного, трудно отделяемого оксида трифенилфосфина. Альтернативные методы восстановления также не дали удовлетворительного результата. Использование систем H_2/Pd-C, $NaBH_4$/MeOH и Na_2S/EtOH не приводило к образованию целевого амина **42** в принципе. Применение цинковой пыли в ледяной уксусной кислоте сопровождалось образованием этил-8-метил-5,6-дигидротетразоло[1,5-*b*]пиридазин-6-карбоксилата **41.1**, лишь подтверждая существование вещества **41** преимущественно в виде тетразоло[1,5-*b*]пиридазинового таутомера.

Немногочисленные литературные и патентные данные по восстановлению соединений данного хемотипа в основном ограничиваются работами научной школы академика Чупахина О.Н. [131], в которых была продемонстрирована возможность эффективного восстановления подобных систем с применением порошковой меди в ледяной уксусной кислоте. При этом, уже в процессе апробации и оптимизации, было установлено, что температурный режим восстановления соединения **41** является критическим параметром процесса. При проведении реакции именно при 80–85 °C происходит образование целевого соединения **42** с умеренным выходом (порядка 53%), что позволяет избежать побочной реакции ацетилирования экзоциклического атома азота.

Заключительная стадия синтеза включала гетероциклизацию этил-6-амино-5-метилпиридазин-3-карбоксилата **42** с хлорацетоном. Изучение условий её проведения позволило установить сильную зависимость степени конверсии от pH среды. В частности, была показана невозможность достижения полной конверсии исходного гетероциклического синтона в кислой среде за счет протонирования атома *N*-1 и сопутствующей утраты его нуклеофильности. В итоге вариантом выбора оказалось проведение этого процесса в присутствии гидрокарбоната (основание) и сульфата (дегидратирующий агент) натрия с образованием целевого этил-2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоксилата **43** (раздел 3.1 , стр. 100) с выходом 85%.

Принципиально важно, что ни на одной из стадий не использовались реакции, катализируемые комплексами палладия, а также не требовалось

хроматографической очистки. Все превращения осуществлялись посредством простых и технологичных стадий, не требующих специализированного оборудования или сложных каталитических систем. Вместе с тем, уже на данном этапе были выявлены отдельные аспекты, требовавшие дальнейшей оптимизации. Прежде всего, суммарный выход искомого соединения заметно ограничивался сравнительно скромным выходом на стадии восстановления азида, что было связано с высокой растворимостью этилового эфира **42** в водной среде при экстрактивной обработке. Кроме этого, в ходе работы стало очевидно, что множественные трудоёмкие экстракционные операции могут быть заменены более простой кристаллизацией продуктов непосредственно из реакционной смеси, при условии изменения гидрофильно-липофильного баланса молекул соответствующих интермедиатов.

Вариантом выбора для реализации этого подхода стали бутиловые аналоги соответствующих этиловых эфиров. Выбор 1-бутанола был обусловлен его низкой токсичностью и удобством работы с этим спиртом, ввиду совокупности его физико-химических свойств. В результате, такой подход позволил не только существенно упростить выделение сложного эфира **44** и гетероциклического производного **46** за счёт их прямого осаждения из раствора, но и повысить выход стадии восстановления до 85%, при сохранении или увеличении значений выходов на других стадиях синтеза (Рисунок 22).

Более того, именно бутиловый заместитель в соединении **47** обеспечивал практически количественную перекристаллизацию из толуола приводя к продукту с содержанием основного вещества свыше 99%. Полученный результат стал принципиально важным этапом работы, позволив зафиксировать окончательную схему синтеза целевого блока **48** и перейти к разработке заключительных стадий синтеза непосредственно молекулы рисдиплама.

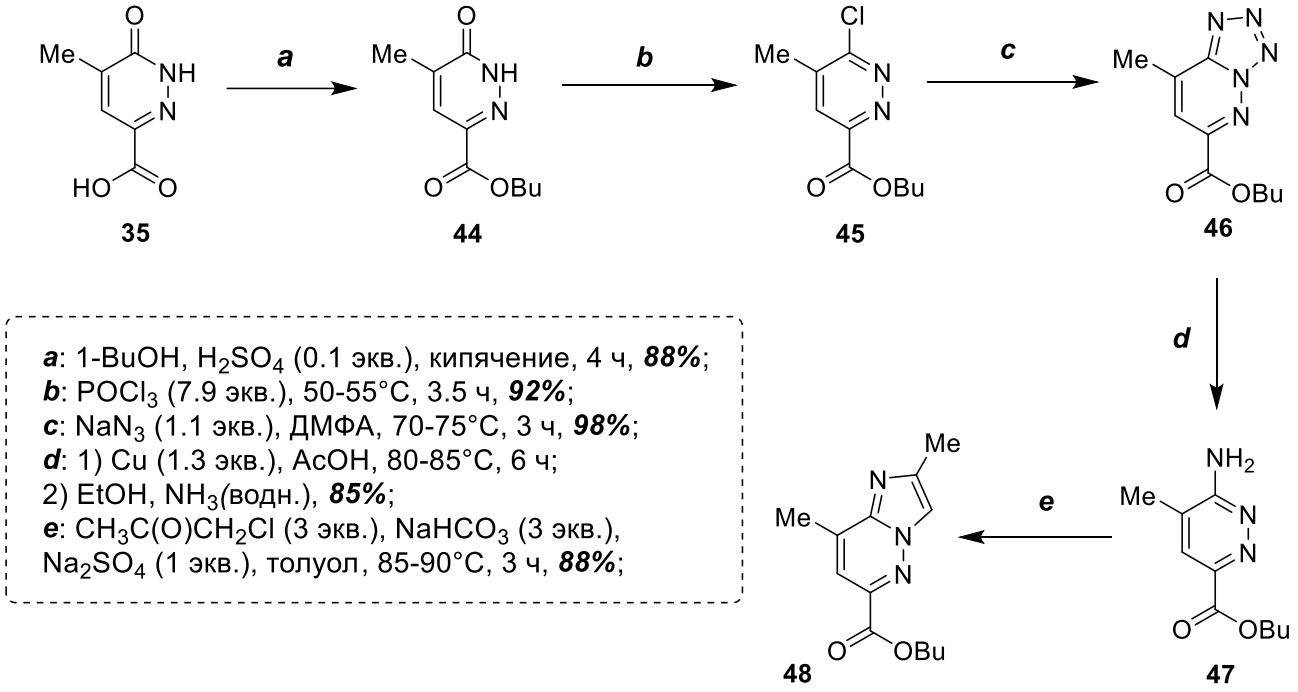
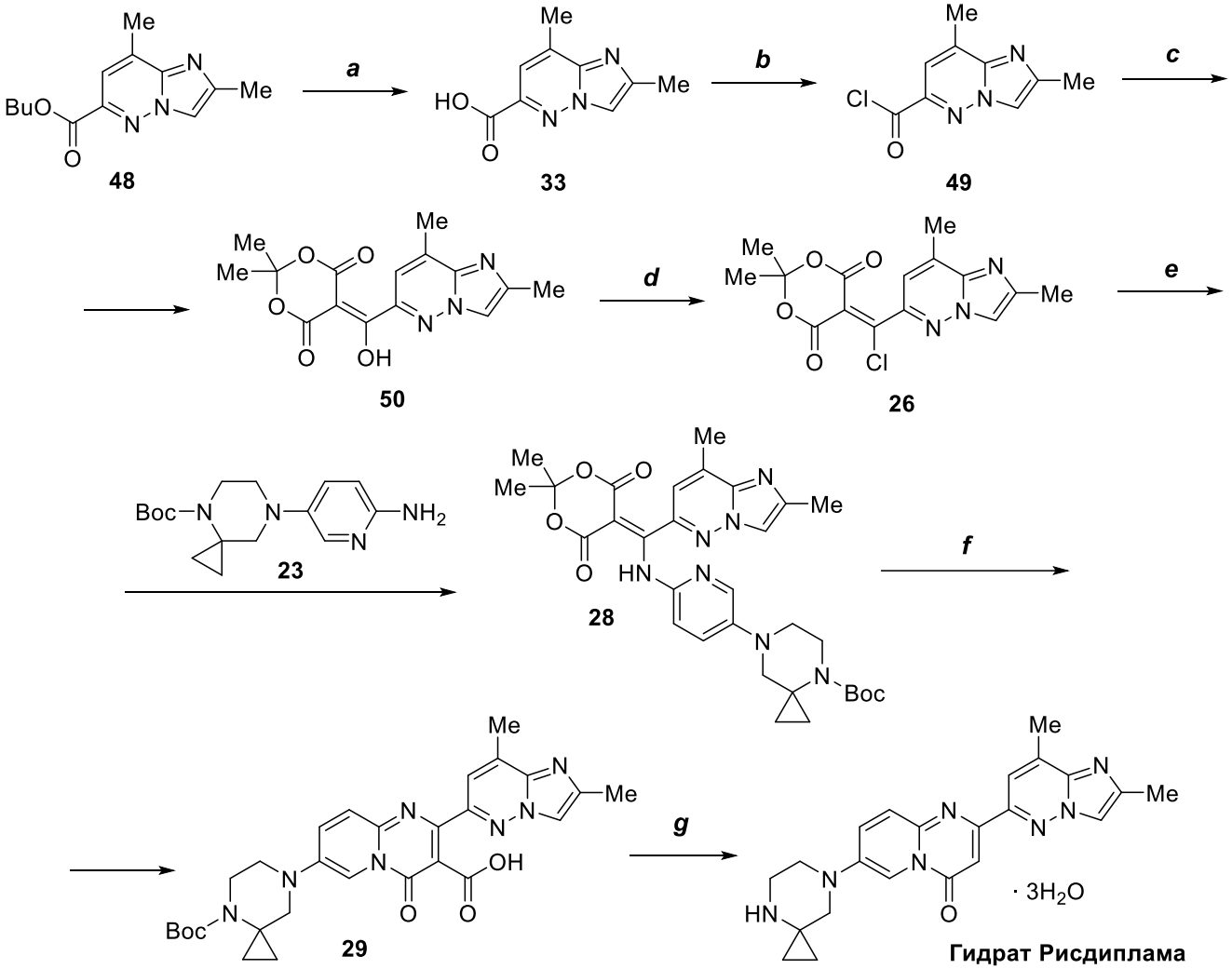


Рисунок 22 – Итоговая схема синтеза ключевого блока **48** из кислоты **35**

2.3 Разработка модифицированного подхода к синтезу рисдиплама с использованием кислоты Мельдрума

В качестве отправной точки для оптимизации был выбран процесс второго поколения, предложенный компанией F. Hoffmann-La Roche Ltd., основанный на использовании производных кислоты Мельдрума [75], который был оставлен разработчиком, вследствие отсутствия стабильных интермедиатов, пригодных для выделения в кристаллическом виде. В ходе экспериментальной проверки этого подхода к получению субстанции рисдиплама, суммарный выход целевого продукта оказался примерно в три раза ниже заявленного и составлял лишь 15–17% в пересчёте на кислоту **33**. В ходе настоящей работы, в этот протокол были внесены многочисленные модификации и усовершенствования (Рисунок 23).

На первом этапе бутиловый эфир **48** омыляли с последующим выделением кислоты **33** с выходом порядка 90%. Дальнейшую оптимизацию проводили на стадии формирования ацилхлорида **49** и его последующего взаимодействия с кислотой Мельдрума.



a: NaOH (5 экв.), H_2O, 50°C, 2ч, затем HCl до pH=3, ***90%***
b: $(COCl)_2$ (1.25 экв.), ДИПЕА (1,25 экв.), ДМФА (кат.), ДХМ, кипячение, 5ч;
c: кислота Мельдрума (1.15 экв.), ДИПЕА (1,25 экв.), ДМАП (0.2 экв.), ДХМ, 0°C - 25 °C, 18ч;
d: трифосген (1 экв.), ДМАП (4 экв.), ДХМ, кипячение, 5ч;
e: ДИПЕА (2 экв.), ДХМ, 25 °C, 5ч, ***80% (в расчете на амин 23)***;
f: *1*-BuOH, 93-95°C, 6 ч;
g: 1) AcCl (7 экв.), *н*-PrOH, 60°C - 105°C, 12-16 ч;
2) NaOH (до pH=13), H_2O, EtOH, 50°C, 6 ч, ***(44.3% в расчете на кислоту 33)***.

Рисунок 23 – Модифицированная схема синтеза гидрата рисдиплама с использованием кислоты Мельдрума

В оригинальном процессе данные превращения были тесно взаимосвязаны за счёт использования стехиометрического количества ДМФА и значительного избытка ДМАП, обеспечивающего сразу несколько функций: гомогенизацию

реакционной смеси, нуклеофильный катализ последующего ацилирования кислоты Мельдрума и связывание образующегося хлороводорода в процессе реакции.

В разработанном варианте была реализована иная организация процесса, основанная на функциональном разделении используемых реагентов. Количество ДМФА было снижено до каталитического, а ДМАП полностью исключён из стадии получения ацилхлорида. Необходимая основность и гомогенность реакционной массы полностью обеспечивалась введением основания Хюнига. В выбранных условиях хлорангидрид **49** образовывался практически количественно и без выделения использовался для последующего ацилирования кислоты Мельдрума.

ДМАП при этом, вводили исключительно в количествах, необходимых только для нуклеофильного катализа (0.2 экв.), что позволяло в конечном итоге, сохранить высокую эффективность превращения при существенно меньшей общей загрузке. Уменьшение содержания ДМАП имело дополнительное значение для аналитического контроля процесса. При его заметном избытке, интенсивное поглощение в УФ-области существенно снижало информативность ТСХ и ВЭЖХ-УФ-анализов, вследствие преобладания сигнала ДМАП над сигналами менее концентрированных компонентов реакционной смеси. Переход к каталитическому количеству, позволил повысить селективность аналитического контроля промежуточных и побочных продуктов.

Следует отметить, что получение производного хлористого винила **26** ранее было описано в литературе лишь однажды – в патенте компании-оригинатора, использовавшей исключительно оксалилхлорид в качестве дезоксихлорирующего агента. Проведённые нами исследования показали, что тот же интермедиат **26** может быть успешно получен с использованием трифосгена по методике Saputra и соавторов [132], если вместо пиридина применять уже использующийся в системе ДМАП в качестве основания.

Такой подход имеет ряд очевидных преимуществ: трифосген более стабилен, менее коррозионно-активен и, в отличие от оксалилхлорида, представляет собой твёрдое вещество при комнатной температуре. Дальнейшее взаимодействие соединения **26** с амином **23** проводили в условиях, близких к опубликованным [75],

за исключением замены Bu_3N на основание Хюнига, ввиду доступности последнего, использования в реакционной смеси на предыдущих стадиях и понятной роли акцептора выделяющегося хлороводорода, с которой одинаково хорошо справляется целый ряд альтернативных трибутиламину оснований.

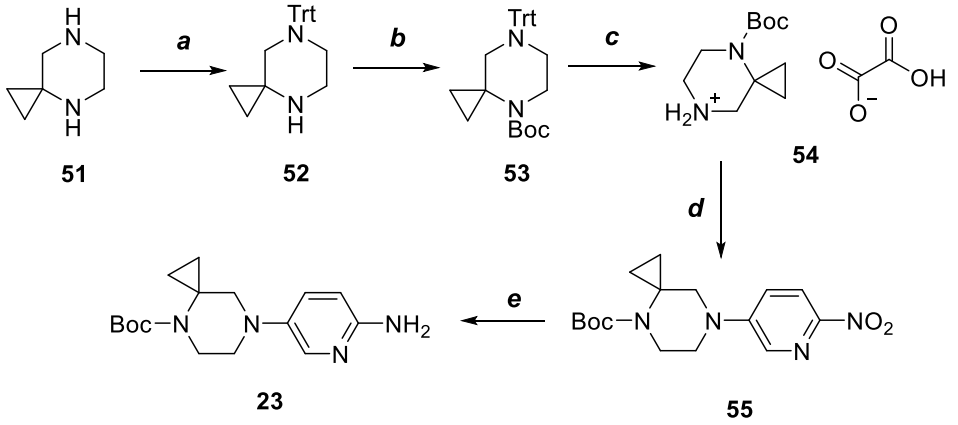
К этому моменту реакционная смесь уже содержала значительное количество солей, примесей и непрореагировавших интермедиатов. Последующие стадии, не сопровождающиеся введением новых структурных фрагментов, но требующие нагревания, существенно осложняли как контроль накопления примесей, так и оценку завершённости процесса. Именно эти обстоятельства, по-видимому, и определяли основные технологические ограничения исходного маршрута. Для их преодоления хлористый метилен на стадии экстрактивной обработки был заменен на МТБЭ, а изменение ионной силы водной фазы достигнуто путем добавления хлористого аммония. Это позволило избежать образования трудно разделяемых эмульсий и получить интермедиат **28** с суммарным выходом 80% в расчете на добавленный амин **23**. Полученный продукт стабилен и может быть выделен в кристаллической форме. По этой причине он явился маркером успешной реализации соответствующих стадий процесса.

Циклизацию вещества **28** в соединение **29** осуществляли нагреванием при 95 °C в 1-бутаноле вместо кипячения в 1-пропаноле, как это было описано ранее [75]. Замена растворителей также помогла добиться совершенно нового результата в данном процессе. Дело в том, что термическая гетероциклизация именно в 1-бутаноле позволила выделить еще один чрезвычайно важный интермедиат **29**, который выкристаллизовывается из реакционной массы при комнатной температуре (в случае 1-пропанола, выход кристаллического продукта снижался на четверть, видимо из-за увеличенной растворимости в соответствующем спирте). Получаемый продукт представлял собой ещё одну стабильную контрольную точку синтетического маршрута, при этом основная часть накопленных примесей оставалась в растворе и удалялась на стадии фильтрования, что обеспечивало беспрепятственное протекание заключительных стадий синтеза.

Удаление Boc-защитной группы с одновременным декарбоксилированием соединения **29** проводили действием AcCl в 1-пропаноле (путем *in situ* генерации раствора HCl в спирте), что обеспечивало образование дигидрохлорида рисдиплама при более мягком температурном режиме по сравнению с оригинальными методиками, основанными на использовании 1-бутанола. Было установлено, что эффективность декарбоксилирования существенно зависит от концентрации HCl в реакционной среде, которая снижается по мере нагревания вследствие улетучивания хлороводорода. В связи с этим 1-бутанол был заменён на 1-пропанол, что позволило проводить процесс при более низкой температуре и уменьшить потери HCl. Для поддержания необходимой кислотности реакционной среды, AcCl в 1-пропаноле вводили порционно в течение всего периода декарбоксилирования. В результате дигидрохлорид рисдиплама был получен с выходом ~55% за шесть стадий, в расчете на кислоту **33**. Последующее превращение в форму гидрата осуществляли нейтрализацией гидроксидом натрия в водном этаноле; выход на этой стадии составил 80%, а суммарный выход целевого рисдиплама в форме гидрата – 44% в пересчёте на исходную кислоту **33**.

Синтез *трет*-бутил-7-(6-аминопиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата **23** в свою очередь, осуществляли в целом по схеме, близкой к исходному протоколу [75], однако с одним принципиальным отличием: в качестве исходного соединения использовали 4,7-диазаспиро[2.5]октан **51**, а не *трет*-бутил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилат (Рисунок 24).

Для получения требуемого защищённого региоизомера первоначально менее стерически затруднённый атом азота в соединении **51** защищали трифенилметильной группой. Затем осуществляли региоселективное введение Boc-защитной группы, после чего трифенилметильную защиту селективно удаляли действием щавелевой кислоты с образованием оксалата **54**. На следующем этапе нуклеофильное замещение атома брома в 5-бром-2-нитропиридине с использованием оксалата **54**, с последующим восстановлением нитрогруппы в образующемся соединении **55** приводило к целевому 2-аминопиридину **23**.



a: TrtCl (1.15 экв.), Et_3N (1.5 экв.), MeCN, 25 °C, 8 ч;
b: Boc_2O (1.3 экв.), Et_3N (1.7 экв.), ТГФ, 25 °C, 8 ч;
c: $C_2H_4O_4$ (3 экв.), МТБЭ, ТГФ, 45°C, 12 ч, ***60% (на 3 стадии)***;
d: 5-бром-2-нитропиридин (1экв.), ДБУ (3.5 экв.), LiCl (4 экв.) ДМСО, 85°C, 36 ч, ***70%***;
e: H_2, Pd/C, EtOAc, 45 °C, 8 ч, ***95%***.

Рисунок 24 – Схема синтеза *трет*-бутил-7-(6-аминопиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата **23**

Таким образом, было показано, что даже маршрут, первоначально обладавший серьёзными технологическими недостатками, после существенной доработки может быть превращён в воспроизводимую и препаративно пригодную схему синтеза.

2.4 Совершенно новый подход к синтезу рисдиплама за счет образования ядра 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она через производные 3-аминоакрилата

Как отмечалось ранее в разделе 2.1, подходы, основанные на использовании производных кислоты Мельдрума, не являются единственно возможным направлением для построения молекулы рисдиплама. Именно поэтому ранее был выделен кетоэфир **31** как перспективный интермедиат, потенциально пригодный для реализации альтернативной синтетической стратегии. К настоящему моменту, после разработки технологичного и дешевого подхода к получению ключевого блока **48**, из которого соединение **31** может быть получено в одну стадию, а также

после накопления практического опыта по выделению и анализу субстанции рисдиплама, появились все необходимые предпосылки для перехода к разработке принципиально нового подхода к получению целевого соединения. Как было показано при ретросинтетическом анализе (Рисунок 13), расчленение связи *C*-4/*N*-5 указывает на соответствующий енаминоэфир **30** как на формально доступный и синтетически обоснованный промежуточный интермедиат.

Наиболее очевидный и формально наиболее простой путь к соединению **30** заключался в прямой конденсации соответствующего производного 2-аминопиридина с β-кетоэфиром **31**. Получение последнего осуществляли путем конденсации эфира **48** с этилацетатом по Кляйзену в присутствии ЛДА при пониженной температуре, что позволяло выделять соединение **31** с высоким выходом и хорошей чистотой. Однако примеров последующей конденсации с использованием нового субстрата **31** в открытых источниках описано не было, как и самого соединения **30**. В связи с этим, основываясь на родственных методиках, для катализа этой реакции были использованы следующие кислоты Льюиса: TsOH, $Bi(OTf)_3$ и $InBr_3$.

В результате, ни один из указанных подходов не привёл к образованию желаемого интермедиата. Использование моногидрата TsOH в среде одного из высококипящих растворителей, выбранных из ряда толуол, анизол и нитробензол, во всех случаях приводило преимущественно к образованию нецелевого продукта гидролиза и декарбоксилирования – 1-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)этан-1-она **56** (Рисунок 25); например, при проведении реакции в толуоле с моногидратом TsOH данное соединение было выделено с выходом 70%. Примечательно, что при температурах ниже 100 °C, β-кетоэфир **31** оставался неизменным. В случае применения трифлата висмута или бромида индия, основным продуктом, по-видимому, являлся N-(5-бромпиридин-2-ил)-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-3-оксопропанамид **57** (Рисунок 25), на что указывали данные ВЭЖХ-УФ-МС, включая наблюдаемую молекулярную массу и характерное изотопное распределение.

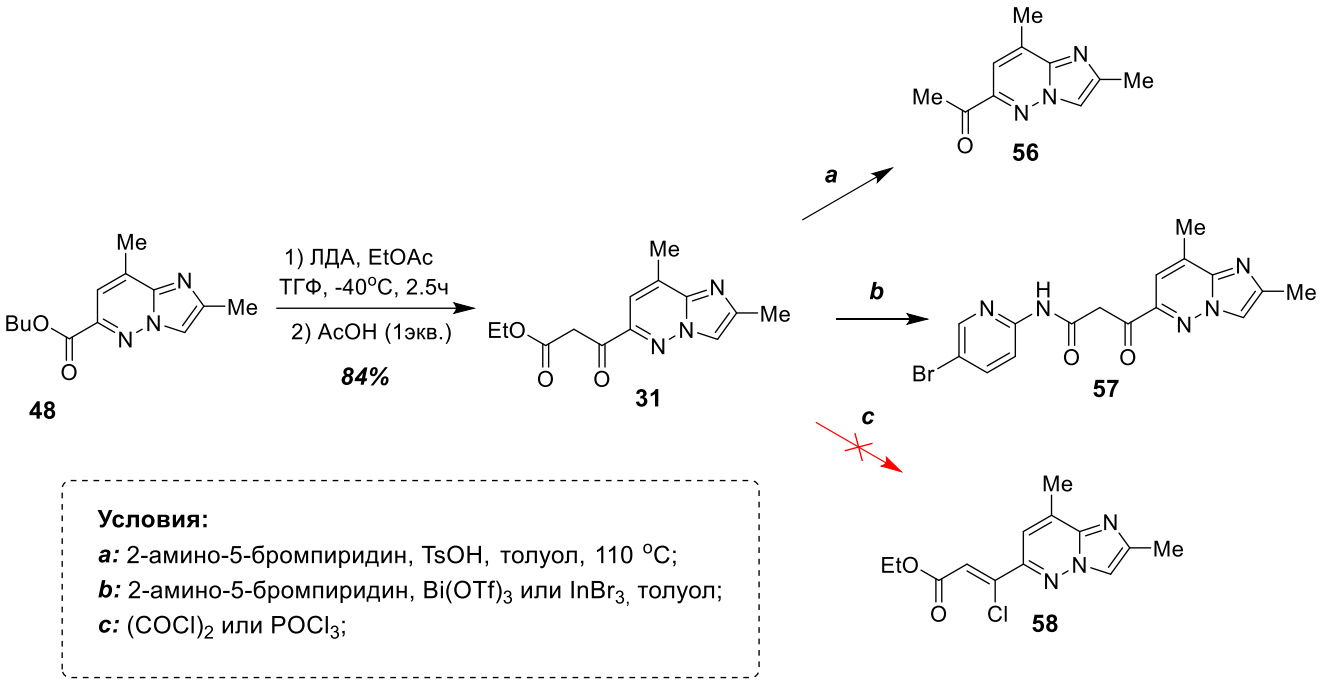


Рисунок 25 – Изучение прямой конденсации соединения **31** с 2-амино-5-бромпиридином

Неудача прямой конденсации, вероятно, была обусловлена совокупностью стерических и электронных факторов, связанных со структурой исходного кетоэфира. С одной стороны, кето-группа в субстрате **31** пространственно экранирована. С другой стороны, дополнительным неблагоприятным фактором, по-видимому, служит кулоновское отталкивание между атомом азота в боковой цепи производного 2-аминопиридина и неподелённой электронной парой атома азота в пиридазиновом фрагменте.

Альтернативная стратегия заключалась во взаимодействии 2-амино-5-бромпиридина с соответствующим производным 3-хлоракриловой кислоты. Для этого была предпринята попытка синтеза замещённого этил-3-хлоракрилата **58** из соответствующего β-кетоэфира **31** с расчётом на последующее замещение атома галогена и индуцированную гетероциклизацию. Оксалилхлорид, рассматривавшийся в данном случае как мягкий агент для дезоксихлорирования, оказался неэффективен, тогда как оксихлорид фосфора не вступал в целевую реакцию при комнатной температуре и приводил к заметному разложению исходного вещества уже при 50–60 °C.

Для преодоления указанных трудностей было решено реализовать своего рода «рокировку» между нуклеофильным и электрофильным компонентами. Иными словами, производное 2-аминопиридина было заменено на соответствующий 2-галогенпиридин, тогда как β-кетоэфир **31** – на соответствующий 3-аминоакрилат **59**. Такой подход представлялся более предпочтительным как с точки зрения ожидаемой реакционной способности, так и с точки зрения контроля селективности. Так соединение **59**, в свою очередь, успешно получили с высоким выходом путем обработки β-кетоэфира **31** ацетатом аммония в уксусной кислоте при кипячении в толуоле (Рисунок 26).

Выбор подходящего дигалогензамещённого пиридина осуществляли, исходя из следующих соображений. Предполагалось, что атом галогена в 2-положении пиридинового кольца (Hal_1) должен достаточно легко вступать в реакцию замещения в условиях медь(I)-катализируемой гетероциклизации, тогда как атом галогена в 5-положении должен сохраняться в этих же условиях неизменным. Вместе с тем, последний должен был оставаться потенциально пригодным для последующего некаталитического замещения спироциклическим аминным фрагментом.

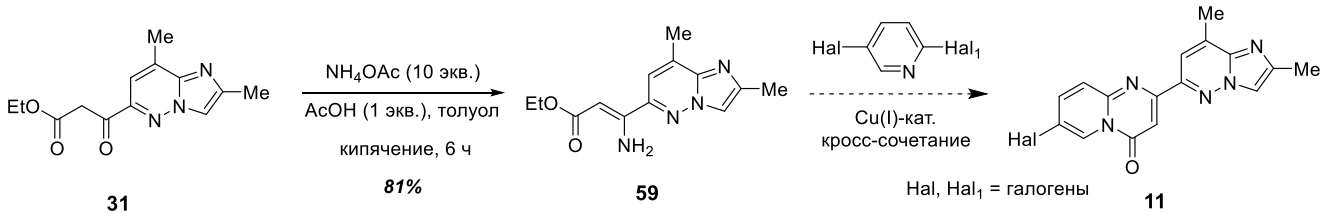
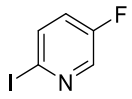
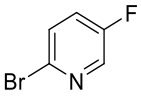
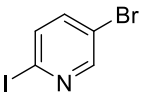


Рисунок 26 – План разработки нового воспроизводимого подхода к синтезу ядра 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она **11** через 3-аминоакрилат **59**

Поскольку параметры растворителя и температурный режим для похожего типа гетероциклизации ранее были предложены для более простых субстратов в работе Мо и соавторов [133], указанные условия проведения реакции были экстраполированы на интересующее превращение. Кроме этого, несмотря на то что в упомянутой работе в качестве основания использовали гидрокарбонат калия, в

настоящем исследовании он был заменён на карбонат калия, поскольку именно эта соль фактически образуется при нагревании из соответствующей кислой соли. Таким образом, подбор условий гетероциклизации был сосредоточен исключительно на выборе наиболее подходящего субстрата и наиболее эффективного лиганда (Таблица 3).

Таблица 3 – Подбор условий синтеза интермедиата **11**

Субстрат	Источник металла	Лиганд	Основание	Растворитель	T°C	Выход, %
	CuI 20 мол%	Без лиганда	K_2CO_3 (2 экв.)	ДМФА	130°C	29%
		PPh_3 30 мол%				58%
		MePhos 30 мол%				64%
		1,10-Фенантролин 30 мол%				**81%**
	CuI 20 мол%	MePhos 30 мол%				47%
		1,10-Фенантролин 30 мол%				62%
	CuI 20 мол%	MePhos 30 мол%				Смесь продуктов моно- и ди-замещения[1]
		1,10-Фенантролин 30 мол%				

[1] Выявление и характеристика примесей методом ВЭЖХ-УФ-МС

В результате, в качестве оптимального субстрата был выбран 2-иод-5-фторпиридин, а в качестве лиганда – 1,10-фенантролин. Следует отметить, что в исходной работе [133] наилучшие результаты по выходам целевых соединений в целом давали фосфиновые лиганды, и прежде всего MePhos. Однако полученные нами данные хорошо согласуются с результатами, ранее описанными в работах научной школы академика РАН Белецкой И.П. для каталитического аминирования 2-галогенпиридинов [134, 135].

В отличие от классических и хорошо изученных палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания, рассматриваемая трансформация на сегодняшний день подтверждена главным образом эмпирически и не имеет однозначно установленного механизма. В связи с этим для лучшего понимания природы данного превращения, а также с целью расширения возможностей его применения при сборке родственных гетероциклических систем, нами был предложен гипотетический механизм данной гетероциклизации (Рисунок 27).

После успешного построения целевого интермедиата **11a**, дальнейшее продвижение к рисдипламу уже не представляло принципиальных затруднений (Рисунок 28). Исторически, на протяжении всей разработки синтетического маршрута к рисдипламу, стадия замещения атома фтора в соединении **11a** на спироциклический аминный фрагмент оставалась одной из наиболее проблемных и, как правило, протекала с очень низкими выходами. Часть этих затруднений удалось устранить.

Так, региоселективность удалось повысить за счёт использования *трет*-бутил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата вместо незащищённого аналога, а замена ДМСО, проявляющего окислительные свойства при повышенных температурах, на *N*,*N*-диметилацетамид позволила сделать процесс более контролируемым. Тем не менее скорость реакции замещения при использовании *трет*-бутил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата по-прежнему остается одной из самых низких среди ряда родственных аминов, вероятно вследствие 1,3-диаксиальных взаимодействий.

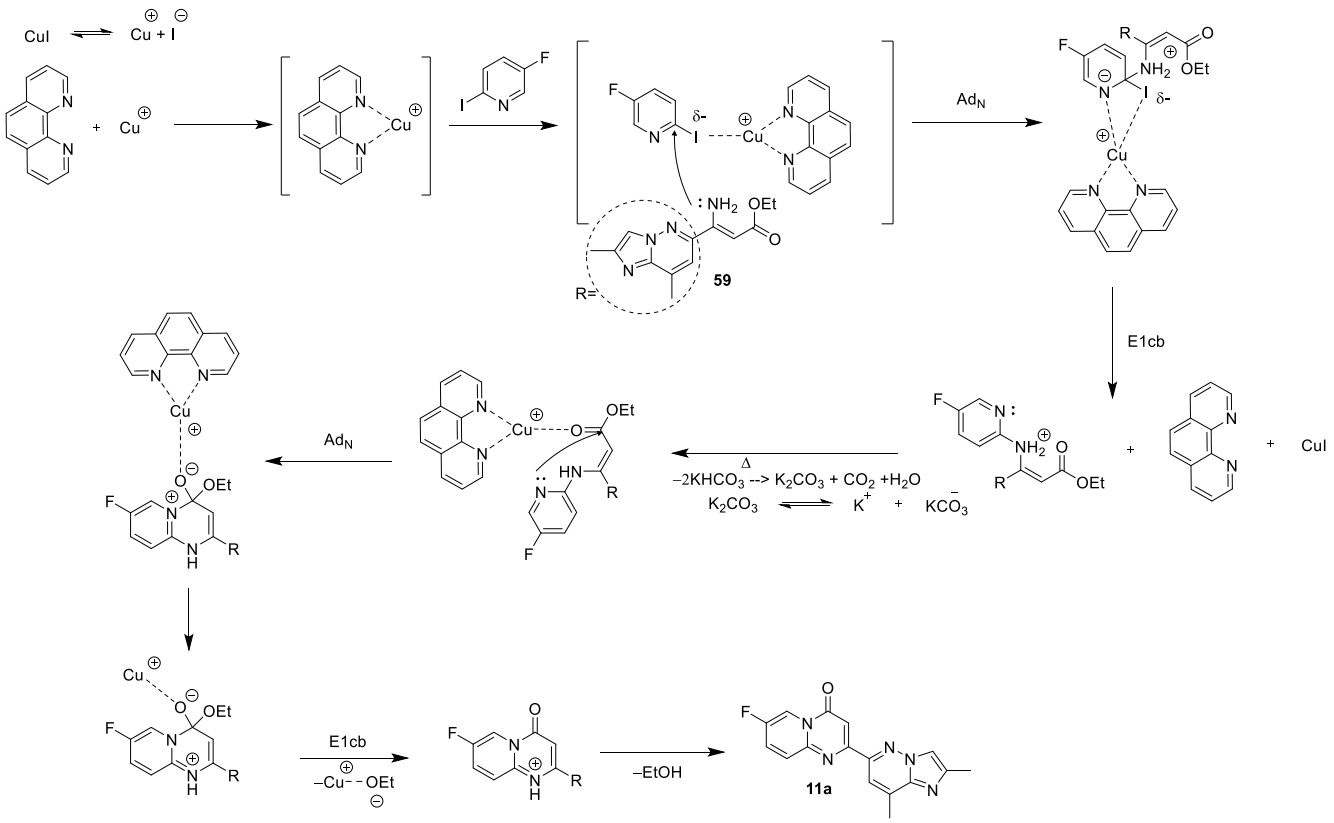
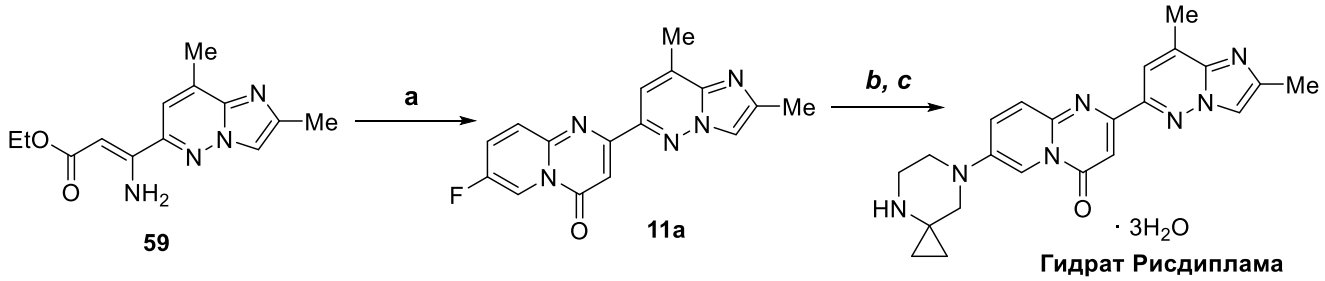


Рисунок 27 – Вероятный механизм Cu(I)-катализируемой гетероциклизации интермедиата **59** и 2-йод-5-фторпиридина с образованием ключевого фрагмента **11a**



a: *2-йод-5-фторпиридин* (1 экв.), CuI (0.2 экв.), 1,10-Фенантролин (0.3 экв.) K_2CO_3 (2 экв.), ДМФА, 130°C, 6 ч, ***81%;***

b: *трет*-бутил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилат, ДБУ (1.1 экв.), ДМА, 120°C, 6 ч, ***42%;***

c: 1) 30% HCl/н-PrOH, н-PrOH, 50°C, 6 ч; 2) NaOH (до pH=13), H_2O, EtOH, 50°C, 6 ч, ***85%***

Рисунок 28 – Оригинальная схема синтеза гидрата рисдиплама на основе производных 3-аминоакриловой кислоты

В результате, длительное нагревание при повышенной температуре приводило к частичному осмолению реакционной смеси и, как следствие, к

заметному снижению суммарного выхода. Тем не менее, некаталитическое замещение атома фтора соответствующим фрагментом *трет*-бутил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата, хотя и протекало лишь с умеренным выходом, в сочетании с простотой выделения и последующим снятием защитной группы обеспечивало получение соответствующего дигидрохлорида рисдиплама (Рисунок 28). Заключительное превращение в гидратную форму свободного основания осуществляли по ранее отработанной схеме.

2.5 Вопросы полиморфизма, контроля родственных и неорганических примесей, а также остаточных органических растворителей

Как следует из литературных данных [75], рисдиплам способен существовать как минимум в семи различных полиморфных модификациях (трех полиморфных формах (форма A, форма B и форма G) и четырех гидратных (форма C, форма D, форма E и форма F)). При этом в качестве целевой формы субстанции была выбрана именно форма A, что было обусловлено совокупностью её наиболее благоприятных свойств, прежде всего негигроскопичностью, а также химической и физической стабильностью [75]. Как известно, полиморфная форма воспроизведенной субстанции может обуславливать различия в растворении, всасывании и системной экспозиции по сравнению с оригинальным препаратом, что способно затруднить подтверждение биоэквивалентности. В связи с этим при разработке новых подходов к получению субстанции рисдиплама наряду с задачами, обозначенными в названии данного раздела, принципиальное значение имело подтверждение соответствия получаемого продукта предпочтительной кристаллической форме A.

Следует отметить, что, как и положено, основные исследования в области полиморфизма рисдиплама были выполнены разработчиками препарата еще в ходе создания окончательной версии промышленного синтеза. Именно на этом этапе было установлено, что форма A характеризуется крайне низкой растворимостью в большинстве органических растворителей при комнатной температуре, как

правило менее 2 мг/мл, за исключением хлороформа. Вместе с тем растворимость субстанции проявляет выраженную pH-зависимость и существенно возрастает в кислой среде. Это, в свою очередь, обусловило разработку процесса реактивной кристаллизации как ключевого способа получения требуемой кристаллической модификации. Также, при разработке процесса кристаллизации правильной полиморфной формы, количество вводимой соляной кислоты и температурный режим на стадии образования и последующей обработки соответствующего гидрохлорида подбирали таким образом, чтобы, с одной стороны, обеспечить достаточную растворимость и стабильность промежуточной солевой формы, а с другой – избежать избыточного накопления хлорида натрия как неорганического побочного продукта. Критическим показателем оказалась и финальная концентрация воды в кристаллизационной системе, поскольку именно она определяла, будет ли происходить выделение целевой формы А или гидратной формы, а также влияла на растворимость хлорида натрия в маточном растворе.

В результате, в оптимизированной процедуре рисдиплам сначала растворяли в водной соляной кислоте в количестве 1,9 эквивалента. Полученный раствор выдерживали при температуре ниже 40 °C и перерабатывали не позднее чем через 24 часа, поскольку более длительное выдерживание приводило к появлению окрашенных примесей в конечной субстанции. Также было установлено, что при температуре выделения 45 °C, максимальное содержание воды в системе не должно превышать 12% (по массе), поскольку именно в этих условиях обеспечивается устойчивое и воспроизводимое получение формы А. В конечном итоге, кристаллизацию в оптимальных условиях инициировали добавлением первой порции водного раствора гидрохлорида рисдиплама к этанольному раствору гидроксида натрия и после характерного помутнения раствора и образования первых кристаллов, добавляли оставшуюся часть раствора гидрохлорида, а затем суспензию выдерживали при 45 °C для достижения полного осаждения рисдиплама в виде свободного основания из раствора (Рисунок 29).

Действительно, на практике было установлено, что рисдиплам, полученный нами по обеим разработанным синтетическим схемам, в исходной точке

выделяется в форме гидрата (формы E, формально соответствующей тригидрату). Это было подтверждено результатами исследования полиморфной формы и полностью согласуется с представлениями, вытекающими из литературных данных.

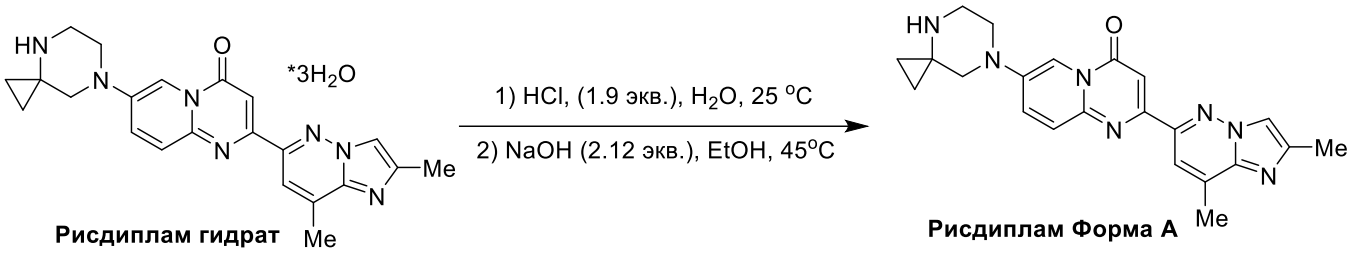


Рисунок 29 – Известные условия процесса финальной перекристаллизации рисдиплама для достижения правильной полиморфной формы

В обоих случаях на заключительной стадии рисдиплам получали из соответствующего гидрохлорида путём растворения соли в смеси воды и этанола с содержанием воды, заведомо превышающим критические значения, необходимые для устойчивого образования формы А, а первое же воспроизведение описанной разработчиками методики действительно приводило к образованию формы А, как и было заявлено выше (Рисунок 30).

Положение синей и красной кривых (полученные экспериментально формы А рисдиплама) соответствует характерным линиям формы А из патента [76]. Важно отметить, что официально зарегистрированного образца рисдиплама в кристаллографической базе данных CCDC нет, поэтому идентификация возможна только за счет сопоставления открытой информации о полиморфной форме от оригинатора с экспериментально полученными наборами двойных Брэгговских углов и полученных на их основе графиков. Линия образца, обозначенная черным (полученная экспериментально гидратная форма, до перекристаллизации) по положению линий полностью соответствует линиям формы E из патента [76]. Более того, в ходе перекристаллизации было установлено, что данная операция одновременно выполняет и функцию дополнительной очистки субстанции.

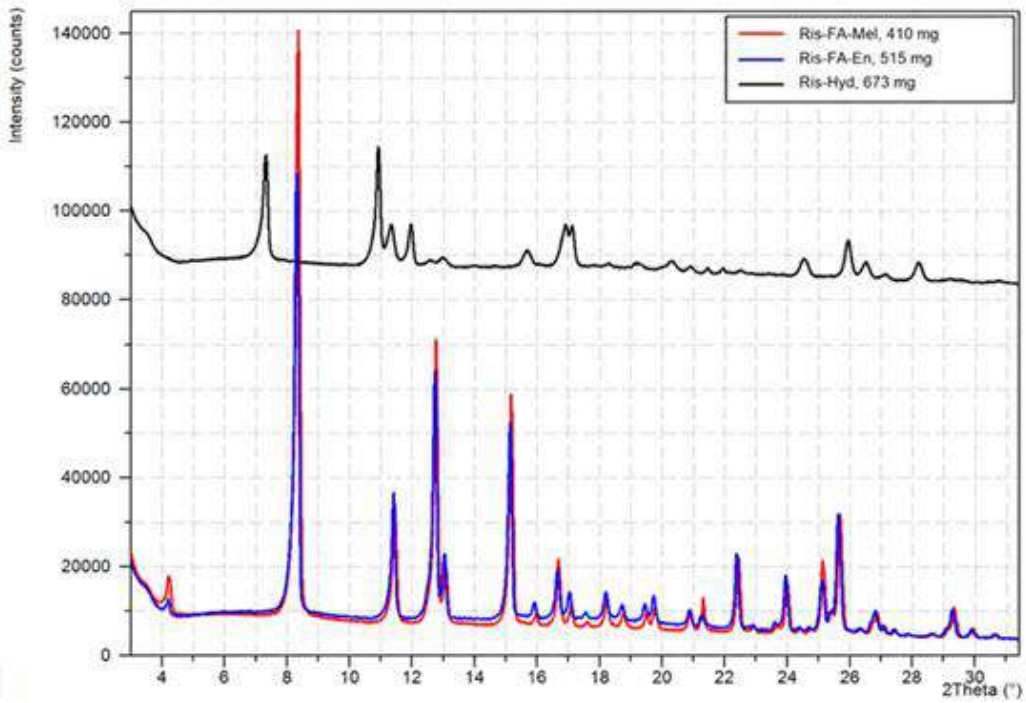


Рисунок 30 – Экспериментальные дифрактограммы полученных образцов рисдиплама: черная линия – гидратная форма, синяя и красная – форма А рисдиплама в терминах [76], полученные по методике от оригинаторов

Так, при исходных значениях химической чистоты на уровне около 98.8%, рассчитанных методом нормализации по данным ВЭЖХ-УФ, две последовательные итерации перекристаллизации позволяли получать вещество с чистотой выше 99.8% для обоих синтетических маршрутов (Рисунок 31А и 31Б).

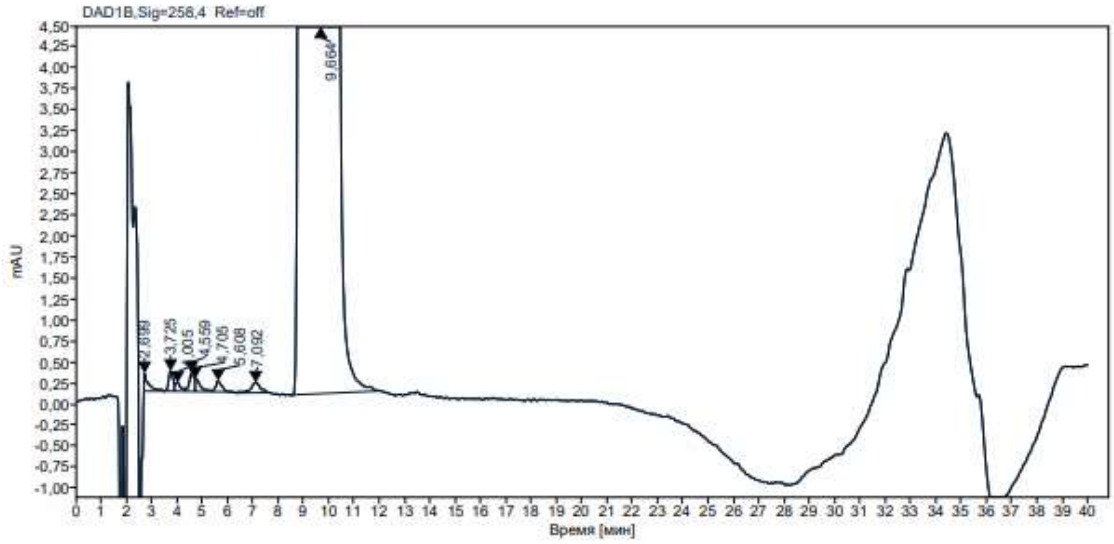
На первый взгляд, полученные результаты позволяют считать задачу практически решённой, поскольку в рамках одной операции одновременно достигалось соответствие двум ключевым параметрам качества – полиморфной форме и химической чистоте. Однако дальнейшее исследование показало, что указанная схема перекристаллизации сопровождается серьёзной проблемой.

Несмотря на эффективное достижение требуемой полиморфной модификации и высоких значений химической чистоты, получаемая субстанция неизменно содержала остаточные количества этанола, существенно превышающие

предел в 5000 м.д., установленный соответствующей общей фармакопейной статьёй (ФЕАЭС 2.3.2.0 «Остаточные органические растворители»).

A)

Название последовательности:	LC 1260 DAD+FC-2026-04-27 12-37-06+03-00	**Название проекта:**	RISDIPLAM_RC_MC
Название пробы:	Ris_FacA	**Оператор:**	admin (admin)
Прибор:	LC 1260 DAD+FC	**Дата ввода пробы:**	2026-04-27 14:43:20+03:00
Объем ввода:	5,000 µL	**Расположение:**	P1-E6
Метод сбора данных:	Risdiplam_0,1%H3PO4_73_ACN_27_RP_Gradient.amx	**Тип:**	Проба
Метод обработки:	*Количественный 3D УФ_DefaultMethod_Risdiplam.pmx		



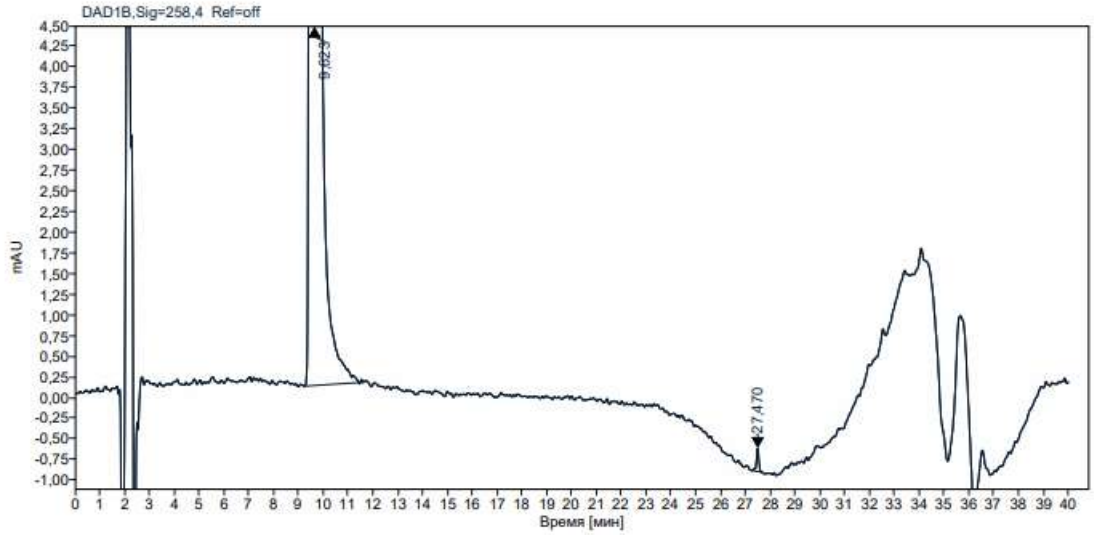
Сигнал: DAD1B,Sig=258,4 Ref=off

Соединение Название	Время, мин	Площадь	Площадь, %	Высота
	2,70	2,6	0,021	0,21
	3,73	2,9	0,023	0,24
	4,01	1,6	0,013	0,10
	4,56	2,9	0,023	0,22
	4,71	2,2	0,017	0,15
	5,61	2,2	0,017	0,13
	7,09	3,3	0,026	0,12
Risdiplam	9,66	12640,6	99,860	459,96
	Сумма	12658,27		

Рисунок 31А – Хроматограмма рисдиплама формы А (после двух перекристаллизаций), полученного по ветке интермедиатов на основе кислоты Мельдрума

Б)

Название последовательности:	LC 1260 DAD+FC-2026-02-19 17-57-06+03-00	**Название проекта:**	RISDIPLAM_RC_MC
Название пробы:	Ris_объединен_CHCl3	**Оператор:**	admin (admin)
Прибор:	LC 1260 DAD+FC	**Дата ввода пробы:**	2026-02-19 20:54:45+03:00
Объем ввода:	3,000 µL	**Расположение:**	P1-B5
Метод сбора данных:	Risdiplam_0,1%H3PO4_73_ACN_27_RP_Gradient.amx	**Тип:**	Проба
Метод обработки:	Количественный 3D УФ_DefaultMethod_Risdiplam.pmx		



Сигнал: DAD1B,Sig=258,4 Ref=off

Соединение Название	Время, мин	Площадь	Площадь, %	Высота
Risdiplam	9,62	6467,6	99,972	569,47
	27,47	1,8	0,028	0,28
	Сумма	6469,43		

Рисунок 31Б – Хроматограмма рисдиплама формы А (после двух перекристаллизаций), полученного по ветке аминоакрилата

Ни один из использованных способов сушки не позволил снизить содержание этанола до нормативного уровня. Это касалось как условно химических подходов, основанных на промывке субстанции различными растворителями, так и физических методов, включая сушку в вакуумном сушильном шкафу, сушку в конвекционном сушильном шкафу, а также тонкий помол с последующей повторной сушкой.

Полученные результаты позволили предположить, что этанол в данном случае не является поверхностно удерживаемым растворителем, а находится внутри кристаллической структуры, либо прочно удерживается иным образом,

вследствие чего его удаление без полного растворения и последующего перестроения кристаллической решётки оказывается невозможным.

С учётом ранее высказанных опасений относительно возможного накопления хлорида натрия в субстанции, дополнительно было проведено исследование остаточного содержания неорганических примесей путем проведения теста на сульфатную золу. Результаты показали, что содержание несгораемого неорганического остатка находилось в диапазоне 1–10% (для различных серий) при предельно допустимом значении 0,1%. По-видимому, основной причиной данного явления являлся недостаток воды в системе, вследствие чего образующийся хлорид натрия не мог в полной мере оставаться в растворённом состоянии и частично осаждался вместе с активной фармацевтической субстанцией. Таким образом, стало очевидно, что оригинальная перекристаллизация, несмотря на её эффективность с точки зрения достижения правильной полиморфной формы и химической чистоты, не решает проблему остаточного этанола и неорганических примесей, а значит не позволяет получать субстанцию приемлемого качества и требует дальнейшей технологической переработки.

В результате потребовалось подобрать такую систему выделения, которая одновременно обеспечивала бы получение целевой полиморфной формы и не приводила к накоплению неорганических солей в субстанции. Наиболее доступным для варьирования параметром представлялась природа кислоты, используемой для перевода рисдиплама в растворимую солевую форму, при условии, что соответствующая натриевая соль будет хорошо растворима либо в спирте, либо в воде. В качестве такого кандидата была выбрана уксусная кислота, поскольку образующийся в процессе нейтрализации ацетат натрия характеризуется высокой растворимостью как в воде, так и в спиртах. Предполагалось, что благодаря этому удастся предотвратить соосаждение неорганической соли вместе с целевым веществом. Действительно, переход к ацетатной системе позволил существенно снизить содержание неорганического остатка: значение сульфатной золы удалось уменьшить до ~0.2%. Однако и этот результат всё ещё не соответствовал требованиям спецификации, поскольку превышал предельное

допустимое значение примерно в два раза. Кроме того, содержание остаточного этанола по-прежнему превышало фармакопейные пределы. Следовательно, даже при очевидном улучшении ситуации, замена соляной кислоты на уксусную не решала проблему в полной мере.

Наиболее очевидным способом дальнейшего снижения содержания как остаточного этанола, так и неорганических солей являлась промывка образующегося осадка водой. Такой подход теоретически должен был обеспечивать практически количественное удаление как растворимых неорганических примесей, так и удерживаемого в системе спирта. Однако литературные данные указывали на нежелательность использования сред с высоким содержанием воды, поскольку это, как предполагалось, могло приводить к изменению полиморфной формы рисдиплама. Вместе с тем прямые экспериментальные доказательства такого перехода, в частности в виде соответствующих порошковых рентгеновских дифрактограмм, приведены не были. Более того, в литературе речь шла, как правило, о длительном выдерживании вещества в водных средах. Исходя из этого, нами было высказано предположение, что кратковременный контакт уже сформированных кристаллов рисдиплама правильной полиморфной формы с чистой водой может не приводить к существенному изменению кристаллической структуры. Для проверки данной гипотезы была осуществлена проточная промывка выделенных кристаллов водой. Принципиально важным условием являлось использование именно чистой воды, а не водно-спиртовой смеси, поскольку присутствие спирта сопровождалось бы частичным растворением вещества, а значит, создавало бы более благоприятные условия для последующего фазового перехода.

Проведённые исследования впервые показали, что кратковременная промывка чистой водой уже сформированных кристаллов рисдиплама не только обеспечивает практически полное удаление остаточного этанола и неорганических солей, но и при этом не приводит к изменению полиморфной формы вещества (Рисунок 32).

Таким образом, финальный вариант перекристаллизации (Рисунок 33) стал завершающим технологическим решением, позволившим воспроизводимо получать субстанцию рисдиплама фармакопейного качества (Таблица 4).

Прямое всестороннее сопоставление разработанных маршрутов с оптимизированным промышленным процессом компании-оригинатора представляется некорректным вследствие существенных различий в их общей архитектуре, синтетической логике и ряде важных факторов, выходящих за рамки собственно химической части процесса.

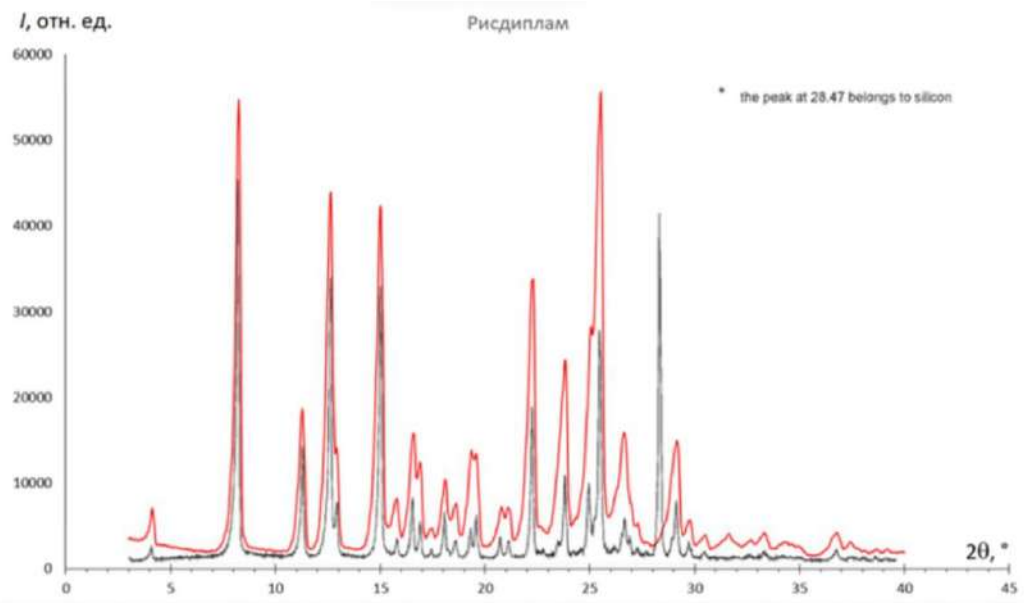


Рисунок 32 – Дифрактограмма, подтверждающая сохранение полиморфной формы после промывки водой (красная линия – эталон, черная – экспериментальные данные)

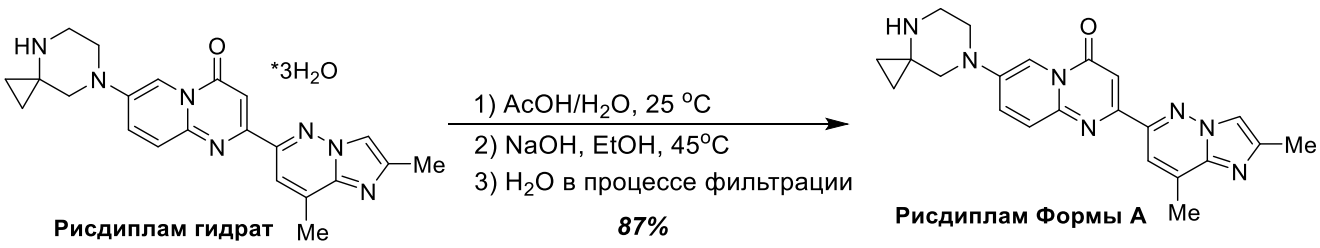


Рисунок 33 – Оптимизированные условия перекристаллизации рисдиплама для достижения требуемых фармакопейных значений контролируемых параметров

Таблица 4 – Результат аналитического контроля АФС рисдиплам, произведенной в рамках лабораторных серий по разработанным методикам

Наименование показателей/ Метод испытаний/ Нормативная ссылка	**Нормативные значения (допустимые пределы)**	**Результат испытаний**
Описание/ Визуальная оценка/ ФЕАЭС 2.3.6.0 «Раздел «Свойства» в частных фармакопейных статьях»	Негигроскопичный кристаллический порошок светло-жёлтого, жёлтого, серовато-жёлтого или зеленовато-жёлтого цвета, который может содержать комочки	Негигроскопичный кристаллический порошок светло-жёлтого цвета
Температура плавления/ Инструментальный капиллярный метод/ ФЕАЭС 2.1.2.42 «Температура плавления – инструментальный метод»	269.0–273.0 °C	270–271 °C
Родственные примеси/ ВЭЖХ-УФ, метод внутренней нормализации/ ФЕАЭС 2.1.2.28 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»; ФЕАЭС 2.3.5.0 «Контроль примесей в субстанциях для фармацевтического применения»; ФЕАЭС 2.3.18.0 «Субстанции для фармацевтического применения»	Основное вещество – не менее 99.00 %; максимальное содержание единичной неидентифицированной примеси <0.10 %	Основное вещество – 99.89 %; макс. ЕНИП <0.05 %
Содержание воды/ Определение воды по К. Фишеру, волюмометрический метод/ ФЕАЭС 2.1.5.12 «Вода: определение полумикрометодом»	Не более 5.0 %	0.657 %
Остаточные неорганические примеси/ Сульфатная зола/ ФЕАЭС 2.1.4.14 «Сульфатная зола»	Не более 0.10 %	0.05 %

Продолжение таблицы 4

Наименование показателей/ Метод испытаний/ Нормативная ссылка	**Нормативные значения (допустимые пределы)**	**Результат испытаний**
Полиморфизм/ Порошковая рентгеновская дифрактометрия/ ФЕАЭС 2.3.4.0 «Полиморфизм»; ФЕАЭС 2.1.10.5 «Определение кристалличности твёрдых веществ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии»	Полиморфная форма субстанции рисдиплама соответствует Форме А	Соответствует Форме А
Остаточные органические растворители/ Газовая хроматография/ ФЕАЭС 2.3.2.0 «Остаточные органические растворители»; ФЕАЭС 2.1.4.19 «Идентификация и контроль остаточных растворителей»; ФЕАЭС 2.1.2.27 «Газовая хроматография»	ФЕАЭС 2.3.2.0 «Остаточные органические растворители»	Этанол – 2753 м.д.; остальные контролируемые растворители – не обнаружены
Содержание основного вещества/ Расчёт методом баланса масс с учётом содержания органических примесей, воды, остаточных органических растворителей и неорганического остатка/ ФЕАЭС 2.3.11.0 «Стандартные образцы»	Не менее 98.0 %	98.9 %

Тем не менее, для ориентировочной оценки может быть использовано простое сравнение по базовым количественным показателям. Так, оригинальный коммерческий процесс, реализованный в конвергентной манере, обеспечивает получение рисдиплама за 11 стадий при суммарном выходе около 21% (считая по самой длинной непрерывной ветви). Разработанный нами маршрут, основанный на медь-катализируемой гетероциклизации, приводит к целевой молекуле за сопоставимые 11 стадий при суммарном выходе 10.1%, тогда как путь с использованием интермедиатов на основе производных кислоты Мельдрума

включает 13 стадий, три из которых реализованы в формате one-pot-процессов, и обеспечивает суммарный выход в 20.5%.

Следует особо подчеркнуть, что указанные оценки были приведены, исходя из интермедиатов, уже содержащих пиридазиновый фрагмент. В реальной синтетической схеме каждая из разработанных методологий включает ещё три начальные стадии, позволяющие превращать очень дешёвые, простые и легкодоступные реагенты в стартовое соединение **35** (первое в цепочке, содержащее пиридазиновое ядро). Такой подход оказывается полностью оправданным, так как не только полностью устраняет зависимость от дорогостоящих коммерческих интермедиатов, но и, как было показано, открывает возможность крупномасштабного получения ранее труднодоступных и ценных строительных блоков **35** и **48**, представляющих самостоятельный синтетический интерес.

В результате, в ходе работы было сформировано понимание ключевых стадий процесса, что позволило создать воспроизводимую технологическую схему, сопровождаемую комплексной стратегией контроля. Сегодня, разработанные процессы не только обеспечивают получение лабораторных серий рисдиплама высочайшего качества, соответствующего всем требованиям ЕАЭС, но и обеспечивают возможность трансфера технологии на производственную площадку.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все используемые реагенты и исходные соединения, если не указано иное, были получены из доступных коммерческих источников и применялись без дополнительной очистки. Органические растворители были подготовлены к использованию в соответствии с общепринятыми методиками [136].

Спектры ЯМР ^{1}H, ^{13}C и ^{19}F зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance Neo (Bruker, Эттлинген, Германия) 400 МГц (400.1, 100.6, 376.5 МГц соответственно) в растворах ДМСО-d6 и $CDCl_3$. В качестве внутреннего стандарта использовали сигналы растворителей (^{1}H: $CDCl_3$, δ = 7.26 м.д., ДМСО-d6, δ = 2.50 м.д.; ^{13}C: $CDCl_3$, δ = 77.16 м.д., ДМСО-d6, δ = 39.52 м.д.). Химические сдвиги δ выражены в миллионных долях (м.д.); мультиплетность: с, синглет; д, дублет; т, триплет; кв., квартет; дд, дублет дублетов; тт, триплет триплетов; дт, дублет триплетов; тд, триплет дублетов; ддд, дублет дублетов дублетов; м, мультиплет; уш.с, уширенный синглет; константы спин-спинового взаимодействия *J* указаны в герцах (Гц). Структуру полученных соединений устанавливали на основании анализа спектров ЯМР ^{1}H и ^{13}C; отнесение сигналов в рутинном порядке проводили с использованием комбинации одномерных и двумерных экспериментов (HSQC, HMBC).

ВЭЖХ-УФ-МС анализ проводили на хроматографе «Vanquish Flex» (Thermo Scientific, США) с диодно матричным детектором «DAD FG» (Thermo Scientific, США) и одноквадрупольным масс спектрометрическим детектором «ISQ EM» (Thermo Scientific, США). Разделение определяемых соединений проводили на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 мм×2.0 мм, размер частиц 1.9 мкм) в следующих хроматографических условиях: с 0 по 7 мин – элюирование от 5% до 95% подвижной фазы Б, с 7 по 13 мин – элюирование в 95% подвижной фазы Б, с 13 по 17 мин – уравновешивание хроматографической колонки в 95% подвижной фазы А. Подвижная фаза А – 0.1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза Б – 0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Температура колонки – 40ºС. Объем

вводимой пробы – 1 мкл, скорость потока – 0.3 мл/мин. Для ионизации образцов использовали источник ионизации электрораспылением. Детектировали ионы положительной полярности в режиме регистрации полного ионного тока, диапазон регистрируемых масс 50 – 700 m/z. Регистрацию спектров поглощения проводили на диодно-матричном детекторе на 4 длинах волн: 210 нм, 240 нм, 280 нм, 300 нм.

Анализ методом ВЭЖХ с УФ-детектированием проводили на хроматографе Prominence-I LC-2030C Plus (Shimadzu, Япония). Градиентное разделение продолжительностью 40 мин осуществляли на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 мм × 4,6 мм; размер частиц 2,7 мкм; размер пор 120 Å). В качестве элюента А использовали воду с добавлением 0,1 % ортофосфорной кислоты, pH которой доводили до 3,5 триэтиламином; в качестве элюента В – ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ. В интервале 0–7 мин проводили градиентное элюирование с изменением соотношения А:В от 7,3:2,7 до 7,0:3,0; в интервале 7–17 мин элюирование проводили при соотношении А:В = 6,9:3,1; 17–20 мин — при А:В = 6,5:3,5; 20–31 мин – при А:В = 0,5:9,5; 31–35 мин – при А:В = 7,3:2,7. В интервале 35–40 мин проводили уравновешивание хроматографической колонки смесью элюентов А:В = 7,3:2,7. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Температура колонки составляла 30 °С, температура автосэмплера – 8 °С, объём вводимой пробы – 5 мкл. Регистрацию проводили с использованием УФ-детектора при длине волны 258 нм.

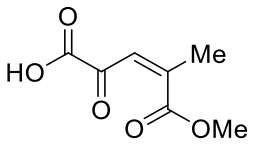
Анализ методом масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) проводили с использованием масс-спектрометра Bruker maXis II 4G ETD (Bruker, Эттлинген, Германия) и хроматографа UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), оснащённого колонкой Acclaim RSLC 120 C18 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; размер частиц 2,2 мкм; 2,1 × 100 мм). Спектры регистрировали в режиме электроспрей-ионизации (ESI) с полным сканированием в диапазоне m/z 100–1500. Тандемные масс-спектры (МС/МС) получали с выбором трёх наиболее интенсивных ионов; диссоциацию, индуцированную столкновениями (CID), проводили при энергии 10–40 эВ, используя азот в качестве газа столкновения.

Исследование образцов методом порошковой рентгеновской дифракции проводили на дифрактометре Empyrean (PANalytical, Нидерланды) с использованием CuKα-излучения (λ = 1,5418 Å) при напряжении на рентгеновской трубке 40 кВ и токе 30 мА. Съёмку осуществляли по схеме Брэгга–Брентано с использованием Ni-фильтра и неотражающей подложки; ширина щели расходимости и антирассеивающей щели составляла 0,5°. Регистрацию дифракционных данных проводили с помощью детектора Pixcel 3D в диапазоне углов 2θ от 3 до 43° с шагом 0,0131° и временем экспозиции 150 с; общая продолжительность съёмки составляла 32 мин 31 с. Сбор и обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Data Collector, Data Viewer и HighScore Plus (PANalytical B.V., Алмело, Нидерланды); для анализа фазового состава использовали базу данных Crystallography Open Database (COD). Идентификацию полиморфных форм рисдиплама проводили путём сопоставления положений дифракционных максимумов и общего профиля экспериментальных дифрактограмм с референсными данными, приведёнными в научной литературе.

ИК-спектры были записаны на спектрометре Bruker Vector 22 FT-IR с таблетками KBr. Температуры плавления определяли на приборе Melting Point Apparatus SMP50 (Norrscope, Бикнакр, Великобритания) при скорости нагрева 1 °C/мин. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинах Merck silica gel 60 F254 с предварительно нанесённым слоем силикагеля (Merck, Рауэй, Нью-Джерси, США). Соединения визуализировали в УФ-свете при длине волны 254 нм либо после обработки нингидрином или фосфорномолибденовой кислотой.

3.1 Методики синтеза и характеризация полученных соединений

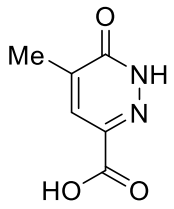
Получение 5-метокси-4-метил-2,5-диоксопент-3-еновой кислоты ***36***



К хорошо перемешиваемой суспензии Na_2CO_3 (5198 г, 49,04 моль, 2 экв.) в MeOH (75,5 л) при 40 °C, со скоростью 350 мл/мин добавляли метилпируват **37** (2500 г, 2,21 л, 24,49 моль, 1 экв.), после чего реакционную смесь выдерживали в течение 1 часа, а затем нагревали при 60 °C в течение 3 ч при постоянном перемешивании. За это время окраска реакционной смеси изменялась от зелёной к жёлто-оранжевой. После завершения реакции (контроль методом ТСХ: *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,55 на исчезновение промежуточного лактона, визуализация в УФ-свете; и появление продукта (элюент ДХМ:MeOH = 3:1 (об./об.), R_f = 0,22, визуализация в УФ-свете) смесь охлаждали до 20–22 °C и фильтровали.

Осадок на фильтре промывали охлаждённым MeOH, объединённый фильтрат упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в деионизированной воде (7,55 л), подкисляли концентрированной H_2SO_4 (0.875л) до pH ≈ 1 и экстрагировали МТБЭ (3 × 3,8 л). Объединённые органические экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (2,5 л), сушили над безводным Na_2SO_4 при интенсивном перемешивании, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. В результате получали техническую 5-метокси-4-метил-2,5-диоксопент-3-еновую кислоту в виде тёмно-оранжевого вязкого масла (1619 г, 76%), которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Получение 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты ***35***



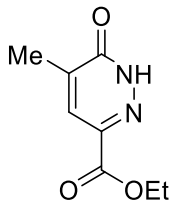
К хорошо перемешиваемому раствору технической 5-метокси-4-метил-2,5-диоксопент-3-еновой кислоты **36** (1616 г, 9,40 моль, 1 экв.), полученной на предыдущей стадии, в MeOH (11,5 л), добавляли со скоростью 95 мл/мин, 100%-ный раствор гидразин-гидрата (940 г, 0,91 л, 18,79 моль, 2 экв.). В процессе добавления протекала экзотермическая реакция, сопровождавшаяся обильным образованием осадка и покраснением маточного раствора. Реакционную смесь

дополнительно перемешивали в течение 1 ч, после чего постепенно охлаждали до 10 °С для достижения полной кристаллизации образовавшейся соли. Полученный осадок отфильтровывали, промывали ледяным MeOH (1 л) и сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Получали 662 г (38%), светло-желтой гидразиниевой соли 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **38**.

Полученную соль **38** растворяли в деионизированной воде (5 л) при 60 °С. После полного растворения, раствор подкисляли концентрированной HCl (0,32 л) до pH ≈ 1. Образовавшуюся суспензию постепенно охлаждали до 10 °С, выдерживали в течение 4 часов для полной кристаллизации 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты и фильтровали. Осадок промывали холодной деионизированной водой (2 × 600 мл), а затем сушили при пониженном давлении, получая 471 г (86%) целевую 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновую кислоту **35** в виде светло-бежевого порошка.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 13.36 (1H, *с*, 1-NH), 7.74 (1H, *кв.*, J = 1.2 Гц, 4-CH), 2.09 (3H, *д*, J = 1.3 Гц, 5-CH_3). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 164.37 (3-COOH), 162.27 (C-6), 139.94 (C-5), 137.42 (C-3), 129.37 (C-4), 16.22 (5-CH_3). HRMS (ESI–): найдено *m/z* 153.0304 $[M - H]^-$; вычислено $C_6H_5N_2O_3^-$ 153.0378. $T_{пл}$ = 256-257°C (с разложением).

*Получение этилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **39***



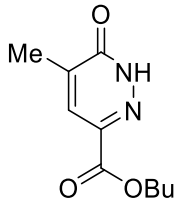
Перемешиваемую суспензию 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **35** (100 г, 0,649 моль, 1 экв.) в EtOH (800 мл), содержащую каталитическое количество концентрированной H_2SO_4 (3,5 мл, 64,9 ммоль, 0,1 экв.), кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. В ходе реакции суспензия постепенно переходила в истинный раствор. После завершения реакции (контроль

методом ТСХ на отсутствие пятна исходного соединения: элюент 1-BuOH:H_2O:AcOH = 4:1:1 (об./об./об.), визуализация в УФ-свете, R_f ~ 0,5) реакционную смесь выдерживали при температуре около +4 °С в течение 12 ч, после чего фильтровали. Осадок на фильтре промывали ледяным EtOH (150 мл) и сушили при пониженном давлении.

Дополнительно, фильтрат упаривали при пониженном давлении, полученный остаток разбавляли деионизированной водой (300 мл) и нейтрализовали насыщенным раствором $NaHCO_3$ (150 мл). Остаточное количество целевого этилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты дополнительно экстрагировали МТБЭ (3 × 150 мл). Объединённые органические экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (200 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Объединённые порции этилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **39** в виде сероватого порошка сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Получали 102,8 г продукта (87%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 13.43 (1H, *с*, 1-NH), 7.75 (1H, *кв.*, J = 1.4 Гц, 4-CH), 4.30 (2H, *кв.*, J = 7.1 Гц, $C\underline{H}_2CH_3$), 2.10 (3H, *д*, J = 1.3 Гц, 5-CH_3), 1.30 (3H, *т*, J = 7.1 Гц, $CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 162.82 (3-$\underline{C}OOCH_2CH_3$), 162.22 (C-6), 140.19 (C-5), 136.70 (C-3), 129.11 (C-4), 61.85 (3-$COO\underline{C}H_2CH_3$), 16.20 (3-$COOCH_2\underline{C}H_3$), 14.50 (5-CH_3). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 183.0614 $[M + H]^+$; вычислено $C_8H_{11}N_2O_3^+$ 183.0691. $T_{пл}$ = 169-170°C.

Получение бутилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты ***44***

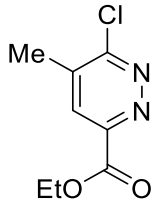


Получен способом, описанном в методике синтеза соединения **39**, с единственным отличием – в момент достижения полной конверсии исходного

вещества, реакционная смесь гомогенизируется, после чего, через некоторое время начинается кристаллизация продукта, приводящая, после охлаждения реакционной смеси и фильтрации осадка, к получению целевого продукта из 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **35** (100 г, 0,649 моль, 1 экв), 1-BuOH (800 мл, 8,76 моль, 13,5 экв, 8 мл/г исходной кислоты) и концентрированной H_2SO_4 (3,5 мл, 0,0649 моль, 0,1 экв), в виде желтоватого порошка с выходом 88% (119,9 г).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 13.39 (1H, *с*, 1-NH), 7.75 (1H, *кв.*, J = 1.3 Гц, 4-CH), 4.26 (2H, *m*, J = 6.6 Гц, $C\underline{H}_2CH_2CH_2CH_3$), 2.10 (3H, *д*, J = 1.3 Гц, 5-CH_3), 1.78-1.58 (2H, *м*, $CH_2C\underline{H}_2CH_2CH_3$), 1.47-1.29 (2H, *м*, $CH_2CH_2C\underline{H}_2CH_3$), 0.92 (3H, *m*, J = 7.4 Гц, $CH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 162.89 (3-$\underline{C}OOCH_2CH_2CH_2CH_3$), 162.21 (C-6), 140.22 (C-5), 136.70 (C-3), 129.12 (C-4), 65.48 (3-$COO\underline{C}H_2CH_2CH_2CH_3$), 30.56 (3-$COOCH_2\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 19.08 (3-$COOCH_2CH_2\underline{C}H_2CH_3$), 16.22 (5-$CH_3$), 14.01 (3-$COOCH_2CH_2CH_2\underline{C}H_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 211.1103 $[M + H]^+$; вычислено $C_{10}H_{15}N_2O_3^+$ 211.1004. $T_{пл}$ = 116-117°C.

Получение этилового эфира 6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты ***40***

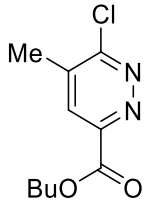


Смесь этилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **39** (102,8 г, 0,565 моль, 1 экв.) и $POCl_3$ (360 мл, 3,85 моль, 6,8 экв.) интенсивно перемешивали при 50–55 °C (температура бани) в течение 3,5 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,33 для исходного соединения и R_f = 0,73 для продукта реакции, визуализация в УФ-свете), реакционную смесь упаривали при пониженном давлении, а полученный остаток растворяли в МТБЭ (500 мл). Полученный раствор при интенсивном перемешивании выливали в 1 л охлаждённого насыщенного раствора $NaHCO_3$. Органическую фазу отделяли, а водную фазу экстрагировали МТБЭ (2 ×

300 мл). Объединённые органические слои последовательно промывали деионизированной водой (300 мл) и насыщенным раствором NaCl (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании и фильтровали. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении, получая этиловый эфир 6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты в виде вязкого оранжевого масла (99.8 г, 88%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.28 (1H, *кв.*, *J* = 0.9 Гц, 4-CH), 4.43 (2H, *кв.*, *J* = 7.1 Гц, C$\underline{H}_2$CH$_3$), 2.47 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 5-CH$_3$), 1.37 (3H, *т*, *J* = 7.1 Гц, CH$_2$C$\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 163.55 (3-$\underline{C}$OOCH$_2$CH$_3$), 162.21 (C-6), 151.23 (C-3), 140.11 (C-5), 130.98 (C-4), 62.55 (3-COO$\underline{C}$H$_2$CH$_3$), 18.95 (5-CH$_3$), 14.49 (3-COOCH$_2\underline{C}$H$_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 201.0452 $[M + H]^+$; вычислено $C_8H_{10}{}^{35}ClN_2O_2^+$ 201.0353.

Получение бутилового эфира 6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты ***45***

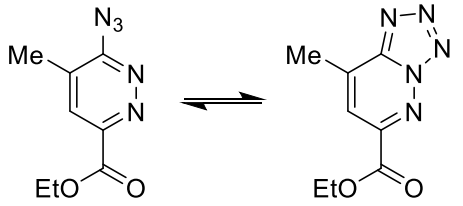


Получен способом, описанном в методике синтеза соединения **40** из *н*-бутилового эфира 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты **44** (115,8 г, 0,551 моль, 1 экв) и $POCl_3$ (405 мл, 4,33 моль, 7,9 экв, 3,5 мл/г исходного эфира), (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C$_6$H$_{14}$:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,4 для исходного соединения и R_f = 0,76 для продукта реакции, визуализация в УФ-свете), в виде вязкой светло-желтой жидкости с выходом 92% (115,5 г).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 8.27 (1H, *кв.*, *J* = 0.9 Гц, 4-CH), 4.39 (2H, *т*, *J* = 6.6 Гц, C$\underline{H}_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 2.47 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 5-CH$_3$), 1.79-1.70 (2H, *м*, CH$_2$C$\underline{H}_2$CH$_2$CH$_3$), 1.50-1.38 (2H, *м*, CH$_2$CH$_2$C$\underline{H}_2$CH$_3$), 0.94 (3H, *т*, *J* = 7.4 Гц, CH$_2$CH$_2$CH$_2$C$\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 163.60 (3-$\underline{C}$OOCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 160.24 (C-6), 151.22 (C-3), 140.13 (C-5), 130.98 (C-4), 66.15 (3-COO$\underline{C}$H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 30.54 (3-COOCH$_2\underline{C}$H$_2$CH$_2$CH$_3$), 19.08

(3-COOCH$_2$CH$_2$<u>C</u>H$_2$CH$_3$), 18.95 (5-CH$_3$), 14.03 (3-COOCH$_2$CH$_2$CH$_2$<u>C</u>H$_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 229.0764 $[M + H]^+$; вычислено $C_{10}H_{14}{}^{35}ClN_2O_2^+$ 229.0666.

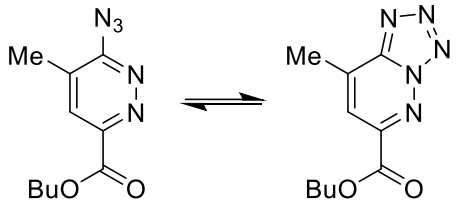
Получение этилового эфира 6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты ***41***



В раствор этилового эфира 6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты **40** (113,2 г, 0,565 моль, 1 экв.) в безводном ДМФА (225 мл) добавляли NaN_3 (40,4 г, 0,621 моль, 1,1 экв.) и перемешивали при 70–75 °C в течение 3 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C$_6$H$_{14}$:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,73 для исходного соединения и R_f = 0,49 для продукта реакции, визуализация в УФ-свете), реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток обрабатывали МТБЭ (600 мл) и промывали деионизированной водой (3 × 200 мл). Органическую фазу отделяли, а минеральный слой дополнительно экстрагировали МТБЭ (2 × 200 мл). Объединённые органические экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (250 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании и фильтровали. Органический фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении, получая технический этиловый эфир 6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты в виде красного масла, которое затем растворяли в 200 мл смеси *н*-C$_6$H$_{14}$ и МТБЭ (3:2, об./об.). При интенсивном перемешивании из полученного раствора выпадал мелкокристаллический осадок. Дополнительное количество кристаллов получали выдерживанием смеси при −20 °C в течение 12 ч. Осадок отфильтровывали, последовательно промывали 100 мл охлаждённой смеси *н*-C$_6$H$_{14}$ и МТБЭ (3:1, об./об.), а затем 200 мл *н*-C$_6$H$_{14}$ и сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Получали этиловый эфир 6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты в виде тёмно-красного кристаллического порошка (107,8 г, 92%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.16 (1H, *кв.*, J = 1.2 Гц, 4-CH), 4.49 (2H, *кв.*, J = 7.1 Гц, C$\underline{H}_2$CH$_3$), 2.82 (3H, *д*, J = 1.2 Гц, 5-CH$_3$), 1.41 (3H, *т*, J = 7.1 Гц, CH$_2$C$\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 161.97 (3-$\underline{C}$OOCH$_2$CH$_3$), 147.22 (C-3), 145.33 (C-6), 139.65 (C-5), 124.16 (C-4), 63.35 (3-COO$\underline{C}$H$_2$CH$_3$), 16.99 (5-CH$_3$), 14.43 (3-COOCH$_2\underline{C}$H$_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 208.0849 $[M + H]^+$; вычислено $C_8H_{10}N_5O_2^+$ 208.0756. $T_{пл}$ = 107-108°C.

Получение н-бутилового эфира 8-метилтетразоло[1,5-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***46***

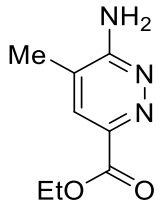


В раствор бутилового эфира 6-хлор-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты **45** (113,4 г, 0,496 моль, 1 экв.) в безводном ДМФА (225 мл, 2 мл/г исходного соединения) добавляли в три равные порции (во избежание дополнительного разогрева реакционной смеси) NaN_3 (35,5 г, 0,546 моль, 1,1 экв) и перемешивали при 70–75 °C в течение 3 ч. После завершения процесса (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,76 для исходного соединения и R_f = 0,51 для продукта реакции, визуализация в УФ-свете), реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и приливали в нее деионизированную воду (2 л). По завершении добавления воды, образовавшуюся суспензию выдерживали при перемешивании в течение ночи, после чего приступили к фильтрации. Осадок тщательно промыли деионизированной водой (3 × 200 мл), а затем сушили до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу при температуре 45 °C и остаточном давлении 1 мбар. В результате получили целевой азид **46** в виде кристаллического порошка тёмно-красного цвета с выходом 98% (114,2 г).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.16 (1H, *кв.*, J = 1.2 Гц, 4-CH), 4.45 (2H, *т*, J = 6.6 Гц, C$\underline{H}_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 2.82 (3H, *д*, J = 1.3 Гц, 5-CH$_3$), 1.89-1.66 (2H, *м*, CH$_2$C$\underline{H}_2$CH$_2$CH$_3$), 1.56-1.35 (2H, *м*, CH$_2$CH$_2$C$\underline{H}_2$CH$_3$), 0.96 (3H, *т*, J = 7.4 Гц,

$CH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 162.03 (3-$\underline{C}OOCH_2CH_2CH_2CH_3$), 147.21 (C-3), 145.33 (C-6), 139.67 (C-5), 124.15 (C-4), 66.91 (3-COO$\underline{C}H_2CH_2CH_2CH_3$), 30.47 (3-$COOCH_2\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 19.06 (3-$COOCH_2CH_2\underline{C}H_2CH_3$), 17.00 (5-$CH_3$), 14.01 (3-$COOCH_2CH_2CH_2\underline{C}H_3$). ИК (см$^{-1}$): 3044, 2973, 2931, 2866, 1739, 1579, 1474, 1380, 1347, 1256, 1187, 1136, 1047, 938, 803, 751. HRMS (ESI+): найдено *m/z* 236.1163 $[M + H]^+$; вычислено $C_{10}H_{14}N_5O_2^+$ 236.1069. $T_{пл}$ = 57-58°C.

Получение этилового эфира 6-амино-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты ***42***



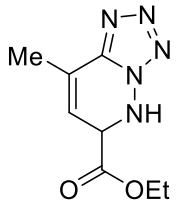
К интенсивно перемешиваемому раствору этилового эфира 8-метилтетразоло[1,5-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты (таутомер этилового эфира 6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты) **41** (99,5 г, 0,481 моль, 1 экв.) в ледяной AcOH (400 мл) при 80–85 °C порциями добавляли медный порошок (40 г, 625 мг-атом, 1,3 экв.) в течение 6 ч. *Осторожно! Реакция сопровождается интенсивным выделением азота.* После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,49 для исходного соединения, визуализация в УФ-свете; элюент EtOAc, R_f = 0,13 для целевого продукта, визуализация в УФ-свете или с использованием нингидрина), растворитель отгоняли при пониженном давлении. Полученный остаток обрабатывали EtOH (200 мл) и фильтровали через слой Celite®. Осадок на фильтре промывали EtOH (2 × 50 мл).

Объединённый фильтрат добавляли к интенсивно перемешиваемой охлаждённой смеси 30%-ного водного раствора NH_3 (400 мл) и деионизированной воды (2,5 л), что приводило к образованию обильного осадка. Осадок отфильтровывали, промывали холодной деионизированной водой и сушили при пониженном давлении. Целевой этиловый эфир 6-амино-5-метилпиридазин-3-

карбоновой кислоты получали в виде коричневого кристаллического порошка (46,14 г, 53%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 7.66 (1H, *кв.*, J = 1.2 Гц, 4-CH), 6.99 (2H, *уш.с*, 6-NH_2), 4.31 (2H, *кв.*, J = 7.1 Гц, C$\underline{H}_2$CH$_3$), 2.11 (3H, *д*, J = 1.1 Гц, 5-CH_3), 1.32 (3H, *т*, J = 7.1 Гц, $CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 164.79 (3-$\underline{C}OOCH_2CH_3$), 162.07 (C-6), 143.15 (C-3), 128.32 (C-4), 122.35 (C-5), 61.13 (3-COO$\underline{C}H_2CH_3$), 16.71 (5-CH_3), 14.68 (3-$COOCH_2\underline{C}H_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 182.0955 [M + H]$^+$; вычислено $C_8H_{12}N_3O_2^+$ 182.0851. $T_{пл}$ = 155-156°C.

Синтез этилового эфира 8-метил-5,6-дигидротетразоло[1,5-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***41.1***

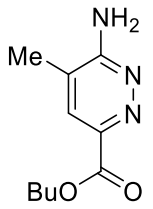


Раствор этилового эфира 8-метилтетразоло[1,5-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты (таутомера этилового эфира 6-азидо-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты) **41** (0,5 г, 2,42 ммоль, 1 экв.) в смеси безводного ТГФ (8 мл) и ледяной AcOH (2 мл) охлаждали до 0 °C, после чего добавляли цинковую пыль (634 мг, 9,7 ммоль, 4 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 ч. После полной конверсии исходного вещества (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,5 для исходного соединения и R_f = 0,3 для целевого продукта) реакцию останавливали добавлением смеси насыщенного водного раствора $NaHCO_3$ (20 мл) и МТБЭ (10 мл), после чего смесь фильтровали. В полученном фильтрате отделили органическую фазу, а водную фазу экстрагировали МТБЭ (2 × 15 мл). Объединённые органические экстракты промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и фильтровали. Полученный фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая технический этиловый эфир 8-метил-5,6-дигидротетразоло[1,5-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты в виде оранжевого масла. Далее, полученное масло растворяли в EtOAc (2 мл) и переосаждали *н*-C_6H_{14} (5 мл), получая

оранжевый порошок. Осадок отфильтровывали, промывали Et_2O (7 мл) и сушили на воздухе до постоянной массы. Получили 130 мг продукта с выходом 25%.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 7.93 (1H, *д*, *J* = 6.8 Гц, 5-NH), 6.36–6.33 (1H, *м*, 7-CH), 5.03-5.00 (1H, *м*, 6-CH), 4.09 (2H, *кв.д*, *J* = 7.1, 4.7 Гц, CH_2CH_3), 2.16 (3H, *с*, 8-CH_3), 1.15 (3H, *т*, *J* = 7.1 Гц, CH_2CH_3). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 168.8 (6-$COOCH_2CH_3$), 146.8 (C-4), 127.1 (C-7), 123.0 (C-8), 61.8 (3-$COOCH_2CH_3$), 57.1 (C-6), 16.2 (5-CH_3), 14.3 (3-$COOCH_2CH_3$). ВЭЖХ-МС (ESI+): найдено *m/z* 210.0 $[M + H]^+$; вычислено $C_8H_{12}N_5O_2^+$ 210.1.

Получение н-бутилового эфира 6-амино-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты ***47***

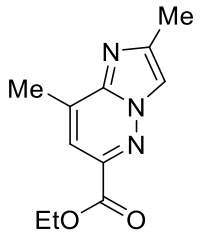


Технический продукт получен способом, описанном в методике синтеза соединения **42** из *н*-бутилового эфира 8-метилтетразоло[1,5-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты **46** (93,3 г, 0,397 моль, 1 экв), порошковой Cu (33 г, 0,516 моль, 1,3 экв) в ледяной AcOH (370 мл, 4 мл/г исходного соединения), (контроль методом ТСХ; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 1:1 (об./об.), R_f = 0,51 для исходного соединения, визуализация в УФ-свете; элюент EtOAc, R_f = 0,19 для целевого продукта, визуализация в УФ-свете или с использованием нингидрина), в виде кристаллического порошка темно-коричневого цвета. Технический продукт после сушки перекристаллизовали из кипящего толуола (5,5 мл/г техн. продукта) с суммарным выходом 85%, получив 70,5 г светло-бежевого порошка.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 7.65 (1H, *кв.*, *J* = 1.1 Гц, 4-CH), 6.98 (2H, *уш.с*, 6-NH_2), 4.27 (2H, *т*, *J* = 6.6 Гц, $C\underline{H}_2CH_2CH_2CH_3$), 2.11 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 5-CH_3), 1.72-1.65 (2H, *м*, $CH_2C\underline{H}_2CH_2CH_3$), 1.52-1.29 (2H, *м*, $CH_2CH_2C\underline{H}_2CH_3$), 0.96 (3H, *т*, *J* = 7.4 Гц, $CH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 164.82 (3-$\underline{C}OOCH_2CH_2CH_2CH_3$), 162.08 (C-6), 143.18 (C-3), 128.31 (C-4), 122.33 (C-5), 64.79 (3-$COO\underline{C}H_2CH_2CH_2CH_3$), 30.75 (3-$COOCH_2\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 19.15

(3-$COOCH_2CH_2\underline{C}H_2CH_3$), 16.72 (5-$CH_3$), 14.05 (3-$COOCH_2CH_2CH_2\underline{C}H_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 210.1269 $[M + H]^+$; вычислено $C_{10}H_{16}N_3O_2^+$ 210.1164. $T_{пл}$ = 149-151°C.

Получение этилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***43***

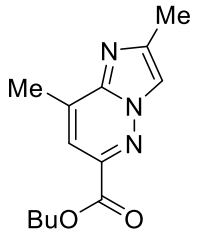


В раствор этилового эфира 6-амино-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты **42** (45 г, 0,248 моль, 1 экв.) в толуоле (250 мл) вносили тонкоизмельчённый $NaHCO_3$ (62,7 г, 0,746 моль, 3 экв.) и безводный Na_2SO_4 (35,2 г, 0,248 моль, 1 экв.). Полученную суспензию при интенсивном перемешивании нагревали до 85–90 °C, после чего по каплям добавляли раствор хлорацетона (61,1 мл, 0,746 моль, 3 экв.) в толуоле (90 мл). *Добавление сопровождалось обильным выделением CO_2!* После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 3 ч до прекращения выделения газа. После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент EtOAc, R_f = 0,13 для исходного соединения и R_f = 0,50 для целевого продукта, визуализация в УФ-свете) смесь фильтровали через слой силикагеля для ТСХ (размер частиц 5–17 мкм, 85 г), после чего фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении. Полученное тёмно-оранжевое масло растворяли в минимальном объёме смеси МТБЭ и *н*-C_6H_{14} (5:1, об./об.) и выдерживали при +4 °C в течение 12 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промывали 100 мл охлаждённой смеси МТБЭ и *н*-C_6H_{14} (5:1, об./об.) и *н*-C_6H_{14} (2 × 30 мл), после чего сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Этиловый эфир 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты получали в виде светло-коричневого порошка (46,2 г, 85%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.20 (1H, *кв.*, *J* = 1.0 Гц, 3-CH), 7.55 (1H, *кв.*, *J* = 1.1 Гц, 7-CH), 4.40 (2H, *кв.*, *J* = 7.1 Гц, $C\underline{H}_2CH_3$), 2.60 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8-CH_3), 2.43 (3H, *д*, *J* = 0.8 Гц, 2-CH_3), 1.36 (3H, *т*, *J* = 7.1 Гц, $CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц,

ДМСО-d_6, δ): 163.42 (6-<u>C</u>OOCH$_2$CH$_3$), 145.27 (C-2), 142.40 (C-6), 139.63 (C-9), 136.28 (C-8), 116.01 (C-7), 115.41 (C-3), 62.34 (6-COO<u>C</u>H$_2$CH$_3$), 16.53 (8-CH$_3$), 15.13 (2-CH$_3$), 14.54 (6-COOCH$_2$<u>C</u>H$_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 220.1113 $[M + H]^+$; вычислено $C_{11}H_{14}N_3O_2^+$ 220.1008. $T_{пл}$ = 109-110°C.

Получение н-бутилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***48***

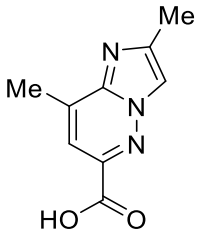


В раствор бутилового эфира 6-амино-5-метилпиридазин-3-карбоновой кислоты **47** (70 г, 0,335 моль, 1 экв.) в толуоле (300 мл) вносили тонкоизмельчённый $NaHCO_3$ (84,4 г, 1,005 моль, 3 экв.) и безводный Na_2SO_4 (47,6 г, 0,335 моль, 1 экв.). Полученную суспензию при интенсивном перемешивании нагревали до 85–90 °C, после чего по каплям добавляли раствор хлорацетона (82,3 мл, 1,005 моль, 3 экв.) в толуоле (125 мл). *Добавление сопровождалось обильным выделением CO_2!* После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 3 ч до прекращения выделения газа. После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент EtOAc, R_f = 0,19 для исходного соединения и R_f = 0,52 для целевого продукта, визуализация в УФ-свете) смесь фильтровали через слой Celite®, после чего однократно промывали толуолом (100 мл). Полученный фильтрат экстрагировали 10% раствором соляной кислоты (3 × 250 мл), а затем объединенный минеральный слой нейтрализовали бикарбонатом натрия до pH = 7, в результате чего наблюдали обильное выпадение осадка. Полученную суспензию отфильтровали, осадок промыли деионизированной водой (2x150 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу (40°C, 1 мбар) до постоянной массы. В результате получили кристаллический порошок светло-коричневого цвета, с выходом 88%, (72,8 г).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.19 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3-CH), 7.53 (1H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 7-CH), 4.35 (2H, *m*, *J* = 6.6 Гц, C<u>H</u>$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$), 2.59 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц,

8-CH_3), 2.42 (3H, *д*, *J* = 0.8 Гц, 2-CH_3), 1.76-1.69 (2H, *м*, $CH_2C\underline{H}_2CH_2CH_3$), 1.47-1.38 (2H, *м*, $CH_2CH_2C\underline{H}_2CH_3$), 0.94 (3H, *m*, *J* = 7.4 Гц, $CH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 163.44 (6-$\underline{C}OOCH_2CH_2CH_2CH_3$), 145.27 (C-2), 142.40 (C-6), 139.63 (C-9), 136.28 (C-8), 115.98 (C-7), 115.42 (C-3), 65.95 (6-COO$\underline{C}H_2CH_2CH_2CH_3$), 30.58 (6-$COOCH_2\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 19.09 (6-$COOCH_2CH_2\underline{C}H_2CH_3$), 16.53 (8-$CH_3$), 15.13 (2-$CH_3$), 14.02 (6-$COOCH_2CH_2CH_2\underline{C}H_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 248.1423 $[M + H]^+$; вычислено $C_{13}H_{18}N_3O_2^+$ 248.1321. $T_{пл}$ = 75-76°C.

Получение 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***33*** из её *н*-бутилового эфира

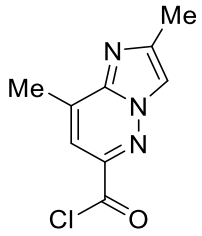


При температуре 50°C, к интенсивно перемешиваемой суспензии н-бутилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты **48** (70 г, 0,283 моль, 1 экв.) в деионизированной воде (450 мл) добавляли NaOH (56,7 г, 1,42 моль, 5 экв.). Полноту протекания реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (система элюирования: этилацетат – исчезновение пятна исходного соединения с R_f 0,52). Реакционную смесь без охлаждения фильтровали на подушке Celite®, полученный фильтрат остужали до комнатной температуры и доводили pH раствора концентрированной соляной кислотой до 3, в результате наблюдали обильное выпадение осадка. Суспензию выдерживали при охлаждении (+4°C) 24 часа. Осадок фильтровали, промывали ледяной деионизированной водой (1×200 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы (50°C, 1 мбар, 24 часа). Остаточные следы воды из полученной 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты удаляли совместным упариванием с толуолом. В результате получали продукт в виде бежевого порошка (48,6 г, 90%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 13.62 (1H, *уш.с*, 6-COOH), 8.14 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3-CH), 7.53 (1H, *д*, *J* = 1.3 Гц, 7-CH), 2.58 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8-CH_3), 2.42

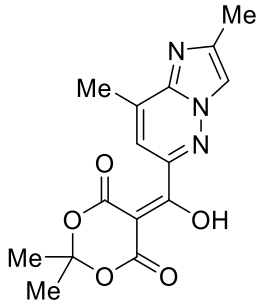
(3H, *д*, *J* = 0.8 Гц, 2-CH_3). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 164.92 (6-<u>C</u>OOH), 144.96 (C-2), 143.29 (C-6), 139.61 (C-9), 136.00 (C-8), 116.22 (C-7), 115.26 (C-3), 16.53 (8-CH_3), 15.10 (2-CH_3). HRMS (ESI–): найдено *m/z* 190.0609 $[M - H]^-$; вычислено $C_9H_8N_3O_2^-$ 190.0695. $T_{пл}$ = 270-271°C (с разложением).

Получение хлорангидрида 2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты ***49***



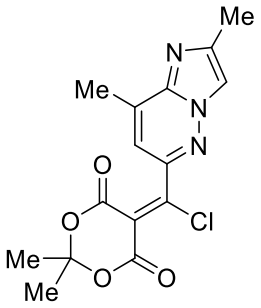
К интенсивно перемешиваемой суспензии 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты **33** (37,2 г, 0,195 моль, 1 экв.) в безводном CH_2Cl_2 (200 мл) добавляли безводный ДМФА (2,2 мл, 30 ммоль, 0,15 экв.) и основание Хюнига (31,48 г, 42,42 мл, 0,244 моль, 1,25 экв.), в результате наблюдали гомогенизацию системы, вследствие растворения исходной кислоты. Далее, при 20–22 °C, по каплям добавляли раствор оксалилхлорида (20,9 мл, 0,244 моль, 1,25 экв.) в безводном CH_2Cl_2 (30 мл). После завершения добавления, реакционную смесь кипятили в течение 5 ч с обратным холодильником при интенсивном перемешивании до полного завершения реакции: (контроль методом ТСХ; элюент ДХМ/MeOH = 4:1 (об./об.) + 50 мкл AcOH, R_f = 0,2 для исходного соединения, визуализация в УФ-свете). Полученный раствор использовали на следующей стадии без выделения и дополнительной очистки.

Получение 5-[(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)(гидрокси)метилен]-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона ***50***



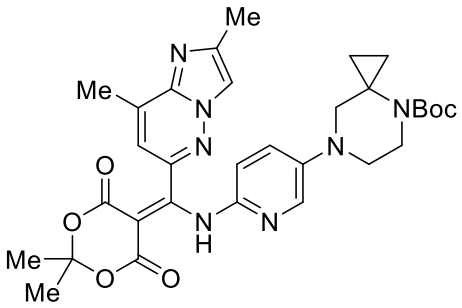
Перемешиваемый раствор свежеперекристаллизованной кислоты Мельдрума (31,7 г, 0,22 моль, 1,15 экв.), ДМАП (4,88 г, 40 ммоль, 0,2 экв.) и основания Хюнига (31,48 г, 42,42 мл, 0,244 моль, 1,25 экв.) в безводном CH_2Cl_2 (150 мл) охлаждали до 0 °C. При последующем добавлении по каплям, раствора хлорангидрида **49**, полученного на предыдущей стадии, реакционная смесь приобретала тёмно-красную окраску. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при 20–22 °C. Ход реакции контролировали методом ТСХ (элюент CH_2Cl_2:MeOH = 4:1 (об./об.), R_f = 0,50 для целевого продукта, визуализация нингидрином). После завершения реакции полученный раствор использовали на следующей стадии без выделения и дополнительной очистки.

Получение 5-[хлор(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)метилен]-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона ***26***



К раствору соединения **50**, полученному на предыдущей стадии, при интенсивном перемешивании добавляли дополнительное количество ДМАП (84,9 г, 0,696 моль; 4 экв. в расчёте на трифосген). Полученный раствор охлаждали до 0 °C, после чего медленно добавляли раствор трифосгена (51,5 г, 0,174 моль, 1 экв.) в CH_2Cl_2 (200 мл). При этом наблюдали образование сначала оранжевой, а затем зелёной суспензии. Полученную суспензию нагревали при кипении с обратным холодильником в течение 5 ч. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС, (ESI+, *m/z* = 336,07; 338,06). После завершения реакции суспензию фильтровали через слой Celite®, осадок промывали CH_2Cl_2 (2 × 50 мл). Фильтрат, содержащий целевой продукт, использовали на следующей стадии без дополнительной охарактеризации и очистки.

Получение трет-бутилового эфира 7-(6-{[(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-илиден)(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)метил]амино}пиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты ***28***

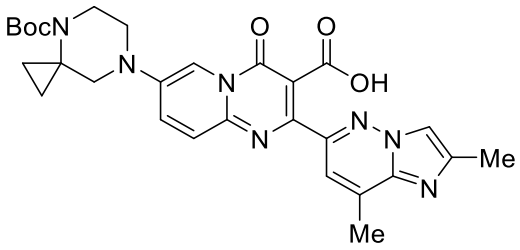


К раствору соединения **26** в CH_2Cl_2, полученному на предыдущей стадии, последовательно добавляли основание Хюнига (66,5 мл, 0,383 моль, 2,2 экв. в расчёте на амин **23**) и раствор *трет*-бутилового эфира 7-(6-аминопиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **23** (52,9 г, 0,174 моль, 0,9 экв. в расчёте на кислоту **33**) в CH_2Cl_2 (200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+, *m/z* = 604,28). После достижения полной конверсии, реакционную смесь охлаждали и растворитель удаляли при пониженном давлении. К полученному остатку добавляли 25%-ный водный раствор NH_4Cl (800 мл) и МТБЭ (800 мл), после чего смесь фильтровали через слой Celite®. Осадок на фильтре промывали смесью 25%-ного водного раствора NH_4Cl (100 мл) и МТБЭ (100 мл), получая прозрачный двухфазный фильтрат. Органическую фазу отделяли, а водную фазу дополнительно экстрагировали МТБЭ (2 × 200 мл). Объединённые органические слои промывали насыщенным раствором NaCl (250 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании и фильтровали. Полученный раствор упаривали досуха, получая технический продукт в виде тёмно-зелёного кристаллического порошка (83,9 г, 80% в расчёте на введённый амин **23**).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 12.49 (1H, *с*, NH), 7.93 (1H, *с*, 3″-CH), 7.75 (1H, *д*, *J* = 2.9 Гц, 6′-CH), 7.22 (1H, *дд*, *J* = 9.1, 3.0 Гц, 4′-CH), 7.14 (1H, *д*, *J* = 1.4 Гц,

7″-CH), 6.87 (1H, *д*, *J* = 9.0 Гц, 3′-CH), 3.50–3.47 (2H, *м*, 6-CH_2), 3.08-3.06 (2H, *м*, 5-CH_2), 2.95 (2H, *с*, 8-CH_2), 2.50 (3H, *с*, 8″-CH_3), 2.37 (3H, *с*, 2″-CH_3), 1.77 (3H, *с*, (CH_3)C(O)(O)(CH_3)), 1.73 (3H, *с*, (CH_3)C(O)(O)(CH_3)), 1.38 (9H, *с*, -C(O)C(CH_3)$_3$), 0.88-0.85 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2), 0.77-0.74 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, *δ*): 165.5 (C=<u>C</u>(=NH)-), 161.2 (2C, -C(=O)-), 154.6 (-<u>C</u>(=O)OC(CH_3)$_3$), 146.7 (C-6″), 145.1 (C-5′), 142.8 (C-2″), 140.4 (C-2′), 138.4 (C-9″), 134.7 (C-8″), 134.6 (C-6′), 123.5 (C-4′), 117.1 (C-3′), 116.9 (C-7″), 114.6 (C-3″), 103.5 (<u>C</u>=C(=NH)-), 87.9 ((CH_3)<u>C</u>(O)(O)(CH_3)), 79.1 ((-C(=O)O<u>C</u>(CH_3)$_3$), 53.3 (C-8), 45.9 (C-5), 44.9 (C-6), 37.2 (C-3), 27.9 ((-C(=O)OC(<u>C</u>H_3)$_3$), 26.2 (2C, (<u>C</u>H_3)$_2$-C(=O)), 16.0 (8″-CH_3), 14.4 (2″-CH_3), 13.5 (C-1, C-2). ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+): найдено *m/z* 604.2 $[M + H]^+$; вычислено $C_{31}H_{38}N_7O_6^+$ 604.3. $T_{пл}$ = 195-196°C

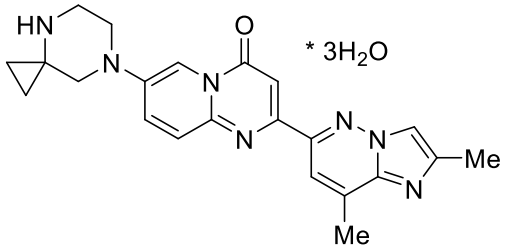
Получение 7-[4-(трет-бутоксикарбонил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4-оксо-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-3-карбоновой кислоты ***29***



Технический продукт **28** (80 г, 0,133 моль), полученный на предыдущей стадии, растворяли в 1-BuOH (320 мл) при интенсивном перемешивании, после чего реакционную смесь нагревали до 95 °C и выдерживали в течение 6 ч. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+, *m/z* = 546,24). После достижения полной конверсии, реакционную смесь охлаждали до 0 °C и выдерживали 12ч. Позднее наблюдали кристаллизацию продукта во всем объеме, полученную суспензию фильтровали, промывали ледяным 1-BuOH (до бесцветных промывных вод) (640 мл), а затем н-гексаном (320 мл) для удаления остатков спирта. Полученный осадок сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы (40°C, 1 мбар, 12 часов). В результате получали ярко-желтый мелкодисперсный порошок с выходом 77% (55,9 г).

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 8.41 (1H, *д*, *J* = 2.5 Гц, 6-CH), 7.85-7.79 (2H, *м*, 8-CH, 9-CH), 7.64 (1H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 3′-CH), 6.92 (1H, *д*, *J* = 1.2 Гц, 7′-CH), 3.81-3.78 (2H, *м*, 6″-CH_2), 3.39-3.37 (2H, *м*, 5″-CH_2), 3.17 (2H, *с*, 8″-CH_2), 2.61 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8′-CH_3), 2.45 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 2′-CH_3), 1.43 (9H, *с*, (-C(=O)OC($\underline{CH_3}$)$_3$), 1.10–1.07 (2H, *м*, 1″-CH_2, 2″-CH_2), 0.86–0.83 (2H, *м*, 1″-CH_2, 2″-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 164.0 (3-$\underline{C}$OOH), 161.5 (C-2), 160.4 (C-4), 155.2 (-$\underline{C}$(=O)OC(CH_3)$_3$), 151.2 (C-6′), 145.3 (C-10), 144.0 (C-7), 143.2 (C-2′), 139.3 (C-9′), 135.4 (C-8′), 132.5 (C-8), 127.3 (C-9), 116.5 (C-7′), 114.6 (C-3′), 109.7 (C-6), 102.5 (C-3), 80.8 (-C(=O)O$\underline{C}$(CH_3)$_3$), 54.4 (C-8″), 46.9 (C-5″), 44.9 (C-6″), 37.1 (C-3″), 28.4 (-C(=O)OC($\underline{CH_3}$)$_3$), 16.8 (8′-CH_3), 14.7 (2′-CH_3), 14.3 (C-1″, C-2″). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 546.2475 $[M + H]^+$; вычислено $C_{28}H_{32}N_7O_5^+$ 546.2387, $T_{пл}$ = 185–186 °C (с разложением).

Получение 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она ***(Рисдиплама гидрата)***



Полученный на предыдущей стадии продукт **29** (55 г, 0,100 моль, 1 экв.) суспендировали при 60 °C в 1-пропаноле (425 мл). Независимый процесс аккуратного прикапывания раствора AcCl (54,95 г, 49,95 мл, 0.700 моль, 7 экв. в расчёте на **29**) к 1-пропанолу (250 мл) при 0 °C генерировал раствор хлороводорода в спирте. Полученный солянокислый спирт прикапывали в три порции (каждые 3 часа) в реакционную смесь, которую кипятили с обратным холодильником в течение 14 ч. Через несколько часов после начала, наблюдали образование жёлтого осадка. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+, *m/z* = 402,20). После завершения реакции, полученную суспензию остужали до комнатной температуры, осадок отфильтровывали, промывали охлаждённым н-пропанолом

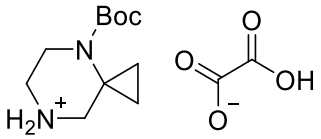
(до бесцветных промывных вод) (3 × 100 мл) и последовательно сушили на воздухе и при пониженном давлении. В результате получали соответствующий дигидрохлорид 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-4-*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде жёлтого порошка.

Далее, полученный дигидрохлорид растворяли в деионизированной воде (150 мл) при интенсивном перемешивании и добавляли EtOH (150 мл). К полученному раствору по каплям добавляли водный раствор NaOH до достижения pH = 13, при этом наблюдали обильное выпадение жёлтого осадка. Полученную суспензию интенсивно перемешивали при 50 °C в течение 6 ч, после чего охлаждали до комнатной температуры и выдерживали при перемешивании ещё 1 ч. Осадок отфильтровывали и промывали смесью H_2O:EtOH = 2:1. Полученный продукт сушили при пониженном давлении при 50 °C до постоянной массы, получая гидрат рисдиплама в виде желто-зеленого порошка (36,4 г, 80%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 8.36 (1H, *д*, *J* = 2.4 Гц, 6-CH), 7.84 (1H, *кв.*, *J* = 1.1 Гц, 7′-CH), 7.72 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3′-CH), 7.66–7.63 (1H, *м*, 9-CH), 7.63–7.59 (1H, *м*, 8-CH), 7.29 (1H, *с*, 3-CH), 3.19–3.16 (2H, *м*, 6″-CH_2), 3.12–3.09 (2H, *м*, 5″-CH_2), 3.00 (2H, *с*, 8″-CH_2), 2.65 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8′-CH_3), 2.47 (3H, *д*, *J* = 0.8 Гц, 2′-CH_3), 0.69–0.66 (2H, *м*, 1″-CH_2, 2″-CH_2), 0.59–0.56 (2H, *м*, 1″-CH_2, 2″-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 158.1 (C-4), 156.2 (C-2), 148.5 (C-6′), 147.2 (C-10), 144.1 (C-2′), 142.2 (C-7), 140.0 (C-9′), 135.6 (C-8′), 131.2 (C-8), 126.7 (C-9), 114.9 (C-7′), 114.7 (C-3′), 110.0 (C-6), 99.2 (C-3), 56.6 (C-8″), 49.9 (C-5″), 44.5 (C-6″), 36.5 (C-3″), 16.9 (8′-CH_3), 14.9 (2′-CH_3), 13.0 (C-1″, C-2″).

В наиболее полном варианте гидратная форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей пики при 7,3; 10,9; 11,3; 12,0; 15,7; 16,9; 17,1; 24,5; 25,9; 26,5 и 28,2° 2θ ± 0,2° 2θ. HRMS (ESI+): найдено *m/z* 402.2051 $[M + H]^+$; вычислено $C_{22}H_{24}N_7O^+$ 402.1964, $T_{пл}$ = 270–271 °C (с разложением).

Получение трет-бутилового эфира 4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты (в виде оксалата) ***54***



К перемешиваемому раствору 4,7-диазаспиро[2.5]октана **51** (53,4 г, 0,477 моль, 1 экв.) в MeCN (200 мл) порциями добавляли Ph_3CCl (153 г, 0,549 моль, 1,15 экв.) и Et_3N (100 мл, 0,716 моль, 1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20–22 °C в течение 8 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ; элюент CH_2Cl_2:MeOH = 9:1 (об./об.), R_f = 0,45 для целевого продукта, визуализация в УФ-свете), образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали MeCN (100 мл) и суспендировали в ТГФ (200 мл). Полученную суспензию фильтровали через слой Celite®, после чего фильтрат упаривали при пониженном давлении. Получали промежуточный 7-тритил-4,7-диазаспиро[2.5]октан **52** в виде вязкого жёлтого масла (143,7 г, 85%), которое при выдерживании при 20–22 °C постепенно кристаллизовалось.

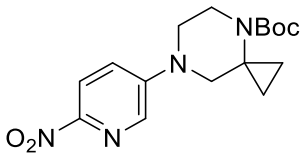
Полученный 7-тритил-4,7-диазаспиро[2.5]октан **52** вновь растворяли в ТГФ (350 мл) и добавляли Et_3N (96 мл, 0,690 моль, 1,7 экв.). Затем к полученному раствору при интенсивном перемешивании добавляли раствор Boc_2O (115,1 г, 0,528 моль, 1,3 экв.) в ТГФ (350 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20–22 °C в течение 8 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ на исчезновение исходного вещества; элюент CH_2Cl_2:MeOH = 9:1 (об./об.) с добавлением капли Et_3N, R_f = 0,45, визуализация в УФ-свете) к смеси добавляли 5%-ный водный раствор $NaHCO_3$ (500 мл). Органическую фазу отделяли, водную фазу дополнительно экстрагировали МТБЭ (2 × 250 мл). Объединённые органические слои промывали насыщенным раствором NaCl (250 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Получали *трет*-бутиловый эфир 7-тритил-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **53** в виде вязкого жёлтого масла (174,8 г, 95%).

Полученный полупродукт **53** растворяли в МТБЭ (400 мл), после чего добавляли раствор щавелевой кислоты (104,2 г, 1,158 моль, 3 экв.) в смеси ТГФ

(200 мл) и МТБЭ (200 мл). Реакционную смесь нагревали до 45 °С и выдерживали при перемешивали в течение 12 ч, затем охлаждали до 20–22 °С. Образовавшийся в ходе реакции осадок отфильтровывали, промывали МТБЭ (2 × 150 мл) и сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Целевой гидрооксалат **54** получали в виде белого порошка (86.4 г, 74% и суммарно 60% на три стадии).

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 3.52–3.50 (2H, *м*, 5-CH_2), 2.87–2.85 (2H, *м*, 6-CH_2), 2.67 (2H, *с*, 8-CH_2), 1.48 (9H, *с*, (-C(=O)OC(CH_3)$_3$), 0.99–0.96 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2), 0.75–0.71 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 155.7 (-<u>C</u>(=O)OC(CH_3)$_3$), 79.7 (-C(=O)O<u>C</u>(CH_3)$_3$), 52.4 (C-8), 48.3 (C-5), 45.6 (C-6), 39.8 (C-3), 28.4 (-C(=O)OC(<u>CH_3</u>)$_3$), 13.6 (C-1, C-2). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 213.1622 [M + H]$^+$; рассчитано $C_{11}H_{21}N_2O_2^+$ 213.1525, $T_{пл}$ = 55–56 °С.

*Получение трет-бутилового эфира 7-(6-нитропиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **55***

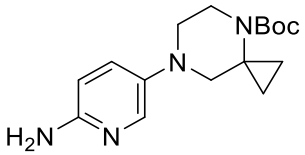


Раствор гидрооксалата **54** (86,4 г, 0,286 моль, 1,05 экв.), 5-бром-2-нитропиридина (55,2 г, 0,272 моль, 1 экв.), ДБУ (144,7 г, 0,952 моль, 3,5 экв.) и LiCl (46,2 г, 1,088 моль, 4 экв.) в сухом ДМСО (400 мл) перемешивали при 85 °С в течение 36 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ по исчезновению исходного реагента; элюент *н*-C_6H_{14}:EtOAc = 2:1 (об./об.), R_f = 0,45 для 5-бром-2-нитропиридина), полученный раствор охлаждали до 20–22 °С и выливали в деионизированную воду (1 л). Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали деионизированной водой (2 × 100 мл) и растворяли в CH_2Cl_2 (2,5 л). Полученный раствор сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 1 ч при интенсивном перемешивании, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в CH_2Cl_2 (400 мл), после чего продукт осаждали добавлением *н*-C_6H_{14} (1,6 л). Полученный жёлтый порошок отфильтровывали, промывали *н*-C_6H_{14} (500 мл) и сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Целевой *трет*-бутиловый эфир 7-(6-нитропиридин-3-ил)-4,7-

диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **55** получали в количестве 63,6 г (70%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.23 (1H, *д*, *J* = 3.0 Гц, 3′-CH), 8.15 (1H, *д*, *J* = 9.2 Гц, 6′-CH), 7.46 (1H, *дд*, *J* = 9.3, 3.1 Гц, 4′-CH), 3.59 (2H, *дд*, *J* = 6.5, 3.9 Гц, 5-CH_2), 3.50 (2H, *м*, *J* = 6.6, 3.9 Гц, 6-CH_2), 3.36 (2H, *с*, 8-CH_2), 1.42 (9H, *с*, (-C(=O)OC$(CH_3)_3$), 0.98–0.95 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2), 0.88–0.85 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 155.1 ((-C(=O)OC$(CH_3)_3$), 150.6 (C-3′), 147.3 (C-6′), 133.9 (C-2′), 121.0 (C-4′), 120.2 (C-5′), 79.9 (-C(=O)OC$(CH_3)_3$), 52.7 (C-8), 48.5 (C-5), 45.3 (C-6), 37.8 (C-3), 28.5 (-C(=O)OC(CH_3)$_3$), 14.0 (C-1, C-2). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 335.1739 $[M + H]^+$; рассчитано $C_{16}H_{23}N_4O_4^+$ 335.1641, $T_{пл}$ = 162–163 °C.

Получение трет-бутилового эфира 7-(6-аминопиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты ***23***

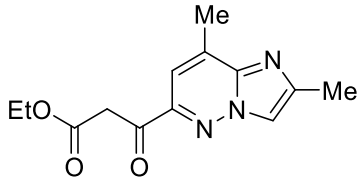


Трет-бутиловый эфир 7-(6-нитропиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **55** (63,6 г, 0,190 моль, 1 экв.) гидрировали в EtOAc (1.4 л) в присутствии 10%-ного Pd/C (15 г) при атмосферном давлении водорода, температуре 45°C и постоянном перемешивании в течение 8 ч. После полного превращения исходного соединения (контроль методом ТСХ; элюент CH_2Cl_2:MeOH = 9:1 (об./об.), R_f = 0,95 для исходного соединения и R_f = 0,69 для продукта; визуализация в УФ-свете и нингидрине), полученную суспензию фильтровали через слой Celite®, а фильтрат упаривали досуха *in vacuo*. В остатке получали технический *трет*-бутиловый эфир 7-(6-аминопиридин-3-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты в виде светло-оранжевого масла, механическая затирка которого, приводила к кристаллизации продукта и получении светло розово-оранжевых кристаллов (54,9 г, 95%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 7.57 (1H, *дд*, *J* = 3.0, 0.7 Гц, 2′-CH), 7.14 (1H, *дд*, *J* = 8.9, 3.0 Гц, 4′-CH), 6.39 (1H, *дд*, *J* = 8.9, 0.7 Гц, 5′-CH), 5.40 (2H, *уш.с.*, 6′-NH_2), 3.54 (2H, *м*, 5-CH_2), 2.89 (2H, *м*, 6-CH_2), 2.74 (2H, *с*, 8-CH_2), 1.41 (9H, *s*, (-

C(=O)OC(<u>CH</u>$_3$)$_3$), 0.93–0.90 (2H, *м*, 1-CH$_2$, 2-CH$_2$), 0.83–0.80 (2H, *м*, 1-CH$_2$, 2-CH$_2$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 154.9 (C-6′), 155.2 (-<u>C</u>(=O)OC(CH$_3$)$_3$), 139.2 (C-3′), 136.5 (C-2′), 128.6 (C-4′), 108.7 (C-5′), 79.4 (-C(=O)O<u>C</u>(CH$_3$)$_3$), 57.2 (C-8), 49.8 (C-6), 46.0 (C-5), 38.2 (C-3), 28.5 (-C(=O)OC(<u>CH</u>$_3$)$_3$), 14.1 (C-1, C-2). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 305.1974 [M + H]$^+$; рассчитано $C_{16}H_{25}N_4O_2^+$ 305.1899. $T_{пл}$ = 81-82 °C.

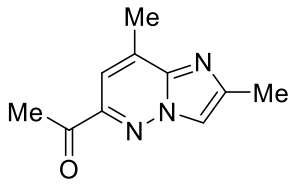
Получение этил-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-3-оксопропионата ***31***



К хорошо перемешиваемому раствору бутилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты **48** (100 г, 0,405 моль, 1 экв.) в смеси абсолютного ТГФ (425 мл) и абсолютного EtOAc (276 мл, 2,84 моль, 7 экв.) в атмосфере аргона после охлаждения до −40 °C добавляли коммерчески доступный 2 М раствор ЛДА в смеси ТГФ–этилбензол–C$_7$H$_{16}$ (710 мл, 1,418 моль, 3,5 экв.). Реакционную смесь постепенно нагревали до 25 °C и выдерживали при этой температуре в течение 2,5 ч. После завершения реакции (контроль методом ТСХ по исчезновению исходного соединения; элюент EtOAc 100%, R_f = 0,52; визуализация в УФ-свете) к реакционной смеси добавляли ледяную AcOH до образования прозрачного раствора, после чего реакцию останавливали добавлением деионизированной воды (420 мл). Органическую фазу отделяли, а водную фазу дополнительно экстрагировали EtOAc (3 × 200 мл). Объединённые органические слои промывали насыщенным раствором NaCl (2 × 150 мл), сушили над безводным Na$_2$SO$_4$, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в минимальном объёме EtOAc, после чего целевой этиловый эфир 3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-3-оксопропановой кислоты **31** осаждали н-гексаном в виде светло-бежевого порошка. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе до постоянной массы. Выход составил 88,8 г (84%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.16 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3-CH), 7.52 (1H, *кв.*, *J* = 1.2 Гц, 7-CH), 4.19 (2H, с, $EtO_2CC\underline{H}_2CO$-), 4.13 (2H, *кв.*, *J* = 7.1 Гц, $C\underline{H}_2CH_3$), 2.60 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8-CH_3), 2.43 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 2-CH_3), 1.17 (3H, *m*, *J* = 7.1 Гц, $CH_2C\underline{H}_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 192.05 (6-$\underline{C}OCH_2CO_2Et$), 167.89 (6-$COCH_2\underline{C}O_2Et$), 146.63 (C-6), 145.69 (C-2), 139.89 (C-9), 136.61 (C-8), 115.43 (C-3), 113.37 (C-7), 61.19 ($COO\underline{C}H_2CH_3$), 44.54 (6-$COO\underline{C}H_2CO_2Et$), 16.62 (8-$CH_3$), 15.13 (2-$CH_3$), 14.44 ($COOCH_2\underline{C}H_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 262.1210 $[M + H]^+$; вычислено $C_{13}H_{16}N_3O_3^+$ 262.1113. $T_{пл}$ = 104-105°C.

*Реакция соединения **31** с 2-амино-5-бромпиридином с образованием 1-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)этан-1-она **56***

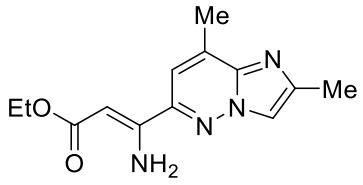


Смесь 3-оксоэфира **31** (0,3 г, 1,15 ммоль, 1,2 экв.), 2-амино-5-бромпиридина (0,17 г, 0,96 ммоль, 1 экв.), TsOH (0,4 г, 2,3 ммоль, 2,4 экв.) и толуола (5 мл) нагревали при кипении с обратным холодильником в атмосфере N_2 в течение 8 ч (контроль методом ТСХ по исчезновению исходного соединения; элюент CH_2Cl_2:MeOH = 95:5 (об./об.), R_f = 0,45; визуализация в УФ-свете). После достижения полной конверсии, реакционную смесь охлаждали до 20–22 °C и фильтровали. Осадок на фильтре промывали толуолом (2 × 5 мл), суспендировали в насыщенном водном растворе $NaHCO_3$ (25 мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 (3 × 25 мл). Объединённые органические слои промывали насыщенным раствором NaCl (2 × 30 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и фильтровали. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении, получая 1-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)этан-1-он **56** в виде бежевого кристаллического порошка. Выход – 152 мг (70%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.16 (1H, *с*, 3-CH), 7.48 (1H, *д*, *J* = 1.3 Гц, 7-CH), 2.64 (3H, *с*, $\underline{CH_3}CO$-), 2.58 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8-CH_3), 2.43 (3H, *с*, 2-CH_3). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 196.7 (6-$\underline{C}OCH_3$), 147.6 (C-6), 145.2 (C-2), 139.9

(C-9), 136.2 (C-8), 115.3 (C-3), 113.4 (C-7), 25.7 (6-CO<u>CH$_3$</u>), 16.6 (8-CH$_3$), 15.1 (2-CH$_3$). ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+): найдено *m/z* 190.2 $[M + H]^+$; рассчитано $C_{10}H_{12}N_3O^+$ 190.1, $T_{пл}$ = 140–141 °C.

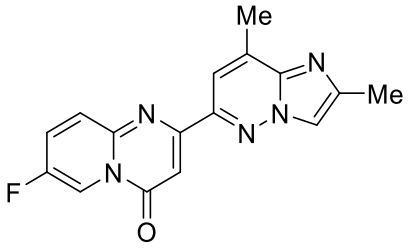
*Получение этил-3-амино-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)акрилата **59***



Перемешиваемую смесь этилового эфира 3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-3-оксопропановой кислоты **31** (88,0 г, 0,337 моль, 1 экв.) и толуола (300 мл) нагревали до 80 °C до полного растворения исходного соединения. Затем добавляли NH_4OAc (130,1 г, 1,69 моль, 5 экв.) и ледяную AcOH (19,25 мл, 0,337 моль, 1 экв.), после чего реакционную смесь нагревали при интенсивном кипении с обратным холодильником в течение 4 ч с использованием насадки Дина–Старка, а затем снова охлаждали до 80 °C. Далее добавляли дополнительное количество NH_4OAc (130,1 г, 1,69 моль, 5 экв.) и вновь нагревали смесь при интенсивном кипении с обратным холодильником еще в течение 2 ч с использованием насадки Дина–Старка до полной конверсии исходного соединения (контроль методом ТСХ; элюент CH_2Cl_2:MeOH = 95:5 (об./об.), R_f продукта = 0,35; визуализация в УФ-свете и нингидрине). После завершения реакции, смесь охлаждали до 20–22 °C, добавляли EtOAc (400 мл) и последовательно промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (2 × 300 мл), деионизированной водой (2 × 300 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 300 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в МТБЭ (200 мл), после чего целевой этиловый эфир 3-амино-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)акриловой кислоты **59** осаждали *н*-гексаном в виде светло-бежевого порошка. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе до постоянной массы. Выход составил 70,9 г (81%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6, δ): 8.02 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3-CH), 7.84 (1H, *уш.с*, NH_2), 7.51 (1H, *д*, *J* = 1.2 Гц, 7-CH), 7.26 (1H, *уш.с*, NH_2), 5.30 (1H, с, =C<u>H</u>-), 4.10 (2H, *кв.*, *J* = 7.1 Гц, C<u>H</u>$_2$CH$_3$), 2.55 (3H, *д*, *J* = 1.2 Гц, 8-CH$_3$), 2.40 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 2-CH$_3$), 1.22 (3H, *т*, *J* = 7.1 Гц, CH$_2$C<u>H</u>$_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6, δ): 169.33 (-<u>C</u>O$_2$CH$_2$CH$_3$), 154.13 (6-<u>C</u>(NH$_2$)=CHCO$_2$Et), 146.03 (C-6), 143.61 (C-2), 138.87 (C-9), 135.67 (C-8), 114.51 (C-3), 113.84 (C-7), 83.52 (6-C(NH$_2$)=<u>C</u>HCO$_2$Et), 58.44 (-CO$_2$<u>C</u>H$_2$CH$_3$), 16.10 (8-CH$_3$), 14.54 (2-CH$_3$), 14.40 (-CO$_2$CH$_2$<u>C</u>H$_3$). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 261.1373 [M + H]$^+$; вычислено $C_{13}H_{17}N_4O_2^+$ 261.1273. $T_{пл}$ = 93-94°C.

Получение 2-(2',8'-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6'-ил)-7-фтор-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она ***11a***

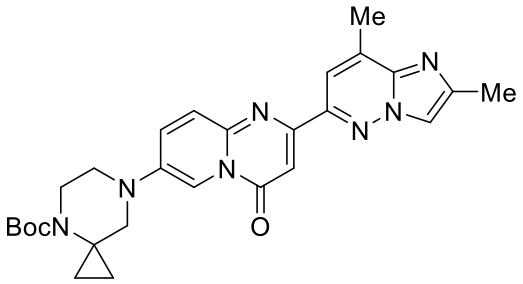


Смесь этилового эфира 3-амино-3-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)акриловой кислоты **59** (70,0 г, 0,269 моль, 1 экв.), 5-фтор-2-йодпиридина (60.04 г, 0,269 моль, 1 экв.), K_2CO_3 (74,2 г, 0.538 моль, 2 экв.), CuI (10,3 г, 0,054 моль, 0,2 экв.), безводного 1,10-фенантролина (14,5 г, 0,081 моль, 0,3 экв.) и безводного ДМФА (250 мл) интенсивно перемешивали при 130 °C в течение 6 ч. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+, *m/z* = 310,10). После завершения процесса, смесь охлаждали до 20–22 °C, добавляли деионизированную воду (600 мл) и экстрагировали $CHCl_3$ (3 × 150 мл). Объединённые органические слои последовательно промывали деионизированной водой (2 × 200 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 100 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в минимальном объёме $CHCl_3$ (190 мл), после чего целевой 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-4-*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он **11a** осаждали в виде жёлто-оранжевого порошка, добавлением избытка гексана

(760 мл). Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход составил 67,3 г (81%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 8.96 (1H, *дд*, *J* = 4.5, 2.8 Гц, 6-CH), 7.85 (1H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 7'-CH), 7.76-7.72 (1H, *м*, 9-CH), 7.73 (1H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 3'-CH), 7.68-7.63 (1H, *м*, 8-CH), 7.38 (1H, *с*, 3-CH), 2.67 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8'-CH_3), 2.48 (3H, *д*, *J* = 0.9 Гц, 2'-CH_3). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 157.78 (C-4, *d*, J^F = 2.1 Гц), 157.54 (C-6'), 154.32 (C-7, *d*, J^F = 247.0 Гц), 149.10 (C-10), 147.87 (C-2), 144.49 (C-2'), 140.03 (C-9'), 135.76 (C-8'), 129.06 (C-8, *d*, J^F = 25.4 Гц), 128.62 (C-9, *d*, J^F = 7.2 Гц), 114.81 (C-7'), 114.70 (C-3'), 113.79 (C-6, *d*, J^F = 41.0 Гц), 100.08 (C-3), 16.88 (8'-CH_3), 14.94 (2'-CH_3). ^{19}F ЯМР (376.5 МГц, $CDCl_3$, *δ*): -131.8 (7-F). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 310.1098 $[M + H]^+$; вычислено $C_{16}H_{13}FN_5O^+$ 310.1026. $T_{пл}$ = 268-269°C (с последующим разложением).

Получение трет-бутил 7-(2'-(2'',8''-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6''-ил)-4'-оксо-4'H-пиридо[1,2-a]пиримидин-7'-ил)-4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоксилата ***27***

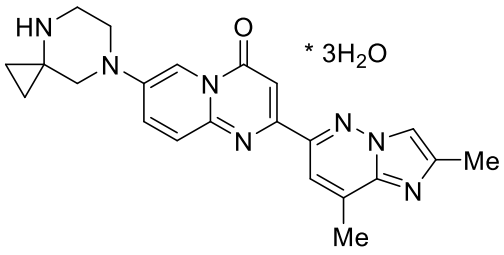


В раствор вещества **11a** (65,0 г, 0,21 моль, 1 экв.) в *N*,*N*-диметилацетамиде (200 мл) добавляли *трет*-бутиловый эфир 4,7-диазаспиро[2.5]октан-4-карбоновой кислоты **54** (в виде свободного основания) (46.4 г, 0,21 моль, 1 экв.), и ДБУ (34,34 мл, 0,23 моль, 1,1 экв.). Полученную смесь перемешивали при 120 °C в условиях защиты от атмосферной влаги и CO_2 до полной конверсии исходного соединения. Ход реакции контролировали методом ВЭЖХ-УФ-МС (ESI+, *m/z* = 502,25). После завершения реакции смесь охлаждали до 20–22 °C и при перемешивании выливали в охлажденную деионизированную воду (1500 мл). Образовавшийся осадок отфильтровывали и сушили при пониженном давлении до постоянной массы. Целевой продукт дополнительно перекристаллизовывали из системы $CHCl_3$/1-

PrOH (1/5 об./об.) и после фильтрования и сушки, в результате получали светло-зеленый порошок – 44,2 г (42%).

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 8.36 (1H, *д*, *J* = 2.5 Гц, 6'-CH), 7.84 (1H, *д*, *J* = 1.2 Гц, 7''-CH), 7.72 (1H, *д*, *J* = 1.0 Гц, 3''-CH), 7.67-7.63 (1H, *м*, 9'-CH), 7.63-7.59 (1H, *м*, 8'-CH), 7.30 (1H, *с*, 3'-CH), 3.70 (2H, *м*, 6-CH_2), 3.21 (2H, *м*, 5-CH_2), 3.00 (2H, *с*, 8-CH_2), 2.66 (3H, *д*, *J* = 1.1 Гц, 8''-CH_3), 2.47 (3H, *д*, *J* = 0.8 Гц, 2''-CH_3), 1.42 (9H, *с*, -$CO_2C(\underline{C}H_3)_3$), 1.06-1.03 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2), 0.84-0.80 (2H, *м*, 1-CH_2, 2-CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$, *δ*): 158.08 (C-4'), 156.31 (C-2'), 155.35 (-$\underline{C}O_2C(CH_3)_3$), 148.46 (C-6''), 147.22 (C-10'), 144.13 (C-2''), 141.92 (C-7'), 140.01 (C-9''), 135.58 (C-8''), 130.90 (C-8'), 126.80 (C-9'), 114.88 (C-7''), 114.67 (C-3''), 110.09 (C-6'), 99.29 (C-3'), 80.52 (-$CO_2\underline{C}(CH_3)_3$), 55.15 (C-8), 48.02 (C-5), 45.33 (C-6), 37.38 (C-3), 28.41 (-$CO_2C(\underline{C}H_3)_3$), 16.86 (8''-$CH_3$), 14.93 (2''-$CH_3$), 14.18 (C-1, C-2). HRMS (ESI+): найдено *m/z* 502.2576 $[M + H]^+$; вычислено $C_{27}H_{32}N_7O_3^+$ 502.2488. $T_{пл}$ = 221-222°C (с разложением).

Получение 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она ***(Рисдиплама гидрата)*** *(по схеме кето- и енамино-эфиров)*



К суспензии вещества **27** (44,0 г, 0,087 моль, 1 экв.) в 1-PrOH (350 мл), нагретой до 50 °C добавляли коммерческий раствор HCl в 1-PrOH (30% масс., 75г, 7 экв.), в результате наблюдали выпадение обильного желтого осадка. Реакционную смесь перемешивали при нагревании до полного расходования исходного соединения (контроль методом ВЭЖХ-УФ-МС). После завершения процесса, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным 1-PrOH (3 × 150 мл) и сушили при пониженном давлении. В результате получали соответствующий дигидрохлорид 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-

7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-4-*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде жёлто-зеленого порошка.

Дальнейшее преобразование дигидрохлорида в свободное основание, а также выделение, сушку и охарактеризацию конечного гидрата осуществляли аналогично методике, описанной выше для синтетической последовательности с использованием производных кислоты Мельдрума. В результате получали 33,6 г (85%) светло желтого порошка конечного продукта.

Получение 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-4-H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она ***(Рисдиплама Форма А)***

Полученный по любой из описанных веток синтеза и высушенный гидрат рисдиплама (35 г, 0,077 моль), растворяли в смеси 9 мл AcOH и 131 мл дистиллированной воды. Параллельно, нагревали абсолютизированный этанол (1250 мл) до 50 °C и растворяли в нем гидроксид натрия (1,15 экв. относительно, добавленной кислоты). Конечный объем воды строго регламентирован следующим правилом: массовая доля воды в конечном растворе (с учетом реакционной и кристаллизационной воды) не должна превышать 12% (масс.). После полного растворения щелочи в спирте и гидрата в воде, раствор последнего переносили в капельную воронку и прикапывали в спиртовую щелочь. В результате наблюдали обильное выпадение осадка желтого цвета. Полученную суспензию перемешивали на остаточном тепле в течение 5 часов, а затем фильтровали и промывали холодным этанолом. Полученный осадок дополнительно промывали деионизированной водой (2 × 200 мл) при активном перемешивании на фильтре, после чего сушили в вакуумном сушильном шкафу в течение 42 часов. В результате получали рисдиплам формы А в виде светло-желтого порошка (26,8 г, 87%). Сводные аналитические результаты полученной серии субстанции приведены в разделе 2.5 в таблице 4.

В наиболее полном варианте кристаллическая форма А характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей пики при 4,2; 8,3; 11,4; 12,8; 15,2; 16,7; 22,4; 24,0; 25,1; 25,7 и 29,3° 2θ ± 0,2° 2θ.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, в представленной диссертационной работе были разработаны подходы к получению рисдиплама и ключевых интермедиатов его синтеза из доступного сырья и без использования реакций кросс-сочетания, катализируемых комплексами палладия. Перспективы дальнейшего развития работы связаны с промышленным освоением предложенных маршрутов, а также изучением механизма и расширением области применения Cu(I)-катализируемой гетероциклизации. Разработанные подходы рекомендуются для получения функционализированных пиридазинов, имидазо[1,2-*b*]пиридазинов и пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-онов, представляющих интерес для поиска новых биологически активных соединений.

На основании полученных результатов, были сформулированы следующие выводы:

1. На основании ретросинтетического анализа молекулы рисдиплама обосновано использование производных 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты в качестве общего структурного блока для реализации двух альтернативных стратегий построения целевой молекулы. Разработан новый подход к получению исходного пиридазинового фрагмента – 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты – из доступного метилпирувата посредством его кротоновой конденсации с последующей гетероциклизацией образующегося продукта гидразином.
2. Разработана препаративно воспроизводимая последовательность превращений 5-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-карбоновой кислоты, включающая каскад реакций этерификации, дезоксихлорирования, азидирование, восстановления и гетероциклизации, и обеспечивающая получение бутилового эфира 2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-карбоновой кислоты. Предложенный маршрут не требует привлечения

палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания, разделения региоизомеров и промежуточной хроматографической очистки искомых соединений.

3. Разработан модифицированный вариант синтеза рисдиплама через производные кислоты Мельдрума, предусматривающий оптимизацию стадий получения ацилхлорида, хлористого винила (путем реакции дезоксихлорирования в присутствие трифосгена), а также выделение кристаллических полупродуктов в контрольных точках процесса. Реализованные изменения повысили воспроизводимость синтетической последовательности и обеспечили получение АФС рисдиплама с требуемыми показателями качества.
4. Разработан альтернативный способ построения функционализированного ядра 4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она, основанный на медь(I)-катализируемой гетероциклизации соответствующего 3-аминоакрилата с 2,5-дигалогензамещённым пиридином в присутствии 1,10-фенантролина. В реализованном варианте ключевой предпоследний интермедиат синтеза рисдиплама – 2-(2',8'-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6'-ил)-7-фтор-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он получен с выходом 81% без использования реакций палладий-катализируемого кросс-сочетания.
5. Оптимизированы заключительные стадии получения и очистки рисдиплама. Установлено, что кратковременная водная обработка предварительно сформированных кристаллов позволяет снизить содержание остаточных органических растворителей и неорганических примесей без изменения целевой полиморфной Формы А. Полученная субстанция характеризовалась чистотой 99,89% по данным ВЭЖХ-УФ, содержанием максимальной единичной неидентифицированной примеси менее 0,05% и соответствовала установленным критериям приемлемости по контролируемым показателям качества.

Список сокращений и условных обозначений

СМА	– спинальная мышечная атрофия
SMN2	– survival motor neuron 2, ген выживания мотонейрона 2
АФС	– активная фармацевтическая субстанция
ЕАЭС	– Евразийский экономический союз
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
HSQC	– Heteronuclear Single Quantum Coherence, гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
HMBC	– Heteronuclear Multiple Bond Correlation, гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
УФ	– ультрафиолетовый
SMN1	– survival motor neuron 1, ген выживания мотонейрона 1
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
SMN	– survival motor neuron, белок выживания мотонейрона
ISS-N1	– intronic splicing silencer N1, интронный сайленсер сплайсинга N1
hnRNPs	– гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины
АСО	– антисмысловые олигонуклеотиды
FDA	– Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США
EMA	– European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным средствам
ЦНС	– центральная нервная система
AAV9	– adeno-associated virus serotype 9, аденоассоциированный вирус серотипа 9
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер

scAAV9	– self-complementary adeno-associated virus serotype 9, самокомплементарный аденоассоциированный вирус серотипа 9
hERG	– калиевый канал hERG (Kv11.1)
U1 мяРНП	– малый ядерный рибонуклеопротеиновый комплекс U1
ЭСЭ2	– экзонный сплайсинговый энхансер 2
SAR	– structure-activity relationship, взаимосвязь «структура-активность»
GSK-3β	– glycogen synthase kinase 3 beta, киназа гликогенсинтазы-3β
JH2	– Janus homology 2, псевдокиназный домен семейства янус-киназ
TYK2	– tyrosine kinase 2, тирозинкиназа 2
PI3K	– phosphoinositide 3-kinase, фосфоинозитид-3-киназа
CXCR3	– C-X-C motif chemokine receptor 3, хемокиновый рецептор 3 семейства CXC
p53	– опухолевый супрессорный белок p53
MDM2	– mouse double minute 2 homolog, E3-убиквитинлигаза MDM2
ППТС/PPTS	– п-толуолсульфонат пиридиния
B_2Pin_2	– бис(пинаколато)дибор
ДИПЕА/DIPEA	– *N*,*N*-диизопропилэтиламин
ДМСО	– диметилсульфоксид
ПФК	– полифосфорная кислота
dppf	– 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен
XPhos	– 2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил
PCy_3	– трициклогексилфосфин
dba	– дибензилиденацетон
DBDMH	– 1,3-дибром-5,5-диметилгидантоин
ДМА	– N,N-диметилацетамид
XantPhos	– 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен

BrettPhos	– 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил
ТМГ	– 1,1,3,3-тетраметилгуанидин
ДМФА	– N,N-диметилформамид
dppp	– 1,3-бис(дифенилфосфино)пропан
МТБЭ	– метил-трет-бутиловый эфир
ТГФ	– тетрагидрофуран
ВЭЖХ-УФ-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- и масс-спектрометрическим детектированием
ИК-спектроскопия	– инфракрасная спектроскопия
ДМАП	– 4-диметиламинопиридин
ТСХ	– тонкослойная хроматография
TrtCl	– трифенилметилхлорид (тритилхлорид)
ЛДА	– диизопропиламид лития
CCDC	– Cambridge Crystallographic Data Centre, Кембриджский центр кристаллографических данных
ФЕАЭС	– Фармакопея Евразийского экономического союза
ЕНИП	– единичная неидентифицированная примесь

Список литературы

1. Korenev G., Gutenev A. A., Antipin F. V.[и др.]. A Brand-New Metal Complex Catalyst-Free Approach to the Synthesis of 2,8-Dimethylimidazo[1,2-b]pyridazine-6-Carboxylic Acid—A Key Intermediate in Risdiplam Manufacturing Process // Molecules. – 2025. – Т. 30, № 14. – С. 3011.

2. Korenev G., Gutenev A. A., Antipin F. V.[и др.]. A Convenient, Pd-Free Approach to the Synthesis of Risdiplam // Molecules. – 2025. – Т. 30, № 16. – С. 3375.

3. Korenev G., Nawrozkij M. B., Ivanov R. A. Comprehensive Risdiplam Synthesis Overview: From Cross-Coupling Reliance to Complete Palladium Independence // Molecules. – 2025. – Т. 30, № 22. – С. 4365.

4. Патент № RU 2856608 C1. Алкиловые эфиры 2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-карбоновой кислоты, способы их получения и применения в качестве полупродуктов в синтезе рисдиплама : № 2025107314 : заявлено 26.03.2025 : опубликовано 24.02.2026 / Г. Коренев, А. А. Гутенев, Ф. В. Антипин.

5. Патент № RU 2858790 C1. Способ получения 7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (рисдиплама) : № 2025113464 : заявлено 21.05.2025 : опубликовано 24.03.2026 / Г. Коренев, А. А. Гутенев, Ф. В. Антипин, М. Б. Навроцкий.

6. Lunn M. R., Wang C. H. Spinal muscular atrophy // The Lancet. – 2008. – Т. 371, № 9630. – С. 2120–2133.

7. Verhaart I. E. C., Robertson A., Wilson I. J.[и др.]. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q–linked spinal muscular atrophy – a literature review // Orphanet J. Rare Dis. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 124.

8. Lefebvre S., Bürglen L., Reboullet S.[и др.]. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene // Cell. – 1995. – Т. 80, № 1. – С. 155–165.

9. Nishio H., Niba E. T. E., Saito T.[и др.]. Spinal Muscular Atrophy: The Past, Present, and Future of Diagnosis and Treatment // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Т. 24, № 15. – С. 11939.

10. Angilletta I., Ferrante R., Giansante R.[и др.]. Spinal Muscular Atrophy: An Evolving Scenario through New Perspectives in Diagnosis and Advances in Therapies // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Т. 24, № 19. – С. 14873.

11. Macleod M. J., Taylor J. E., Lunt P. W.[и др.]. Prenatal onset spinal muscular atrophy // Eur. J. Paediatr. Neurol. – 1999. – Т. 3, № 2. – С. 65–72.

12. D'Amico A., Mercuri E., Tiziano F. D., Bertini E. Spinal muscular atrophy // Orphanet J. Rare Dis. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 71.

13. Bürglen L., Lefebvre S., Clermont O.[и др.]. Structure and Organization of the Human Survival Motor Neurone (SMN) Gene // Genomics. – 1996. – Т. 32, № 3. – С. 479–482.

14. Lorson C. L., Hahnen E., Androphy E. J., Wirth B. A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1999. – Т. 96, № 11. – С. 6307–6311.

15. Lorson C. L. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN // Hum. Mol. Genet. – 2000. – Т. 9, № 2. – С. 259–265.

16. Yeo C. J. J., Tizzano E. F., Darras B. T. Challenges and opportunities in spinal muscular atrophy therapeutics // Lancet Neurol. – 2024. – Т. 23, № 2. – С. 205–218.

17. Mercuri E., Sumner C. J., Muntoni F.[и др.]. Spinal muscular atrophy // Nat. Rev. Dis. Primer. – 2022. – Т. 8, № 1. – С. 52.

18. Calucho M., Bernal S., Alías L.[и др.]. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases // Neuromuscul. Disord. – 2018. – Т. 28, № 3. – С. 208–215.

19. Singh N. K., Singh N. N., Androphy E. J., Singh R. N. Splicing of a Critical Exon of Human *Survival Motor Neuron* Is Regulated by a Unique Silencer Element Located in the Last Intron // Mol. Cell. Biol. – 2006. – Т. 26, № 4. – С. 1333–1346.

20. Chaytow H., Faller K. M. E., Huang Y.-T., Gillingwater T. H. Spinal muscular atrophy: From approved therapies to future therapeutic targets for personalized medicine // Cell Rep. Med. – 2021. – Т. 2, № 7. – С. 100346.

21. Hua Y., Vickers T. A., Okunola H. L.[и др.]. Antisense Masking of an hnRNP A1/A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice // Am. J. Hum. Genet. – 2008. – Т. 82, № 4. – С. 834–848.

22. Passini M. A., Bu J., Richards A. M.[и др.]. Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy // Sci. Transl. Med. – 2011. – Т. 3, № 72.

23. Hua Y., Sahashi K., Rigo F.[и др.]. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model // Nature. – 2011. – Т. 478, № 7367. – С. 123–126.

24. Ramos D. M., d'Ydewalle C., Gabbeta V.[и др.]. Age-dependent SMN expression in disease-relevant tissue and implications for SMA treatment // J. Clin. Invest. – 2019. – Т. 129, № 11. – С. 4817–4831.

25. Jalali A., Rothwell E., Botkin J. R.[и др.]. Cost-Effectiveness of Nusinersen and Universal Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy // J. Pediatr. – 2020. – Т. 227. – С. 274-280.e2.

26. Obexer R., Nassir M., Moody E. R.[и др.]. Modern approaches to therapeutic oligonucleotide manufacturing // Science. – 2024. – Т. 384, № 6692. – С. eadl4015.

27. Foust K. D., Nurre E., Montgomery C. L.[и др.]. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes // Nat. Biotechnol. – 2009. – Т. 27, № 1. – С. 59–65.

28. Meyer K., Ferraiuolo L., Schmelzer L.[и др.]. Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose–response Study in Mice and Nonhuman Primates // Mol. Ther. – 2015. – Т. 23, № 3. – С. 477–487.

29. Valori C. F., Ning K., Wyles M.[и др.]. Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy // Sci. Transl. Med. – 2010. – Т. 2, № 35.

30. Mendell J. R., Al-Zaidy S., Shell R.[и др.]. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy // N. Engl. J. Med. – 2017. – Т. 377, № 18. – С. 1713–1722.

31. Guillou J., De Pellegars A., Porcheret F.[и др.]. Fatal thrombotic microangiopathy case following adeno-associated viral *SMN* gene therapy // Blood Adv. – 2022. – Т. 6, № 14. – С. 4266–4270.

32. Chand D., Mohr F., McMillan H.[и др.]. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy // J. Hepatol. – 2021. – Т. 74, № 3. – С. 560–566.

33. Strauss K. A., Farrar M. A., Muntoni F.[и др.]. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with two copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy type 1: the Phase III SPR1NT trial // Nat. Med. – 2022. – Т. 28, № 7. – С. 1381–1389.

34. Toro W., Yang M., Georgieva M.[и др.]. Patient and Caregiver Outcomes After Onasemnogene Abeparvovec Treatment: Findings from the Cure SMA 2021 Membership Survey // Adv. Ther. – 2023. – Т. 40, № 12. – С. 5315–5337.

35. ZOLGENSMA | FDA. URL: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma (дата обращения: 30.08.2026).

36. Nuijten M. Pricing Zolgensma – the world’s most expensive drug // J. Mark. Access Health Policy. – 2022. – Т. 10, № 1. – С. 2022353.

37. Naryshkin N. A., Weetall M., Dakka A.[и др.]. *SMN2* splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy // Science. – 2014. – Т. 345, № 6197. – С. 688–693.

38. Pinard E., Green L., Reutlinger M.[и др.]. Discovery of a Novel Class of Survival Motor Neuron 2 Splicing Modifiers for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy // J. Med. Chem. – 2017. – Т. 60, № 10. – С. 4444–4457.

39. Ratni H., Ebeling M., Baird J.[и др.]. Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (*SMN2*) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA) // J. Med. Chem. – 2018. – Т. 61, № 15. – С. 6501–6517.

40. Poirier A., Weetall M., Heinig K.[и др.]. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs // Pharmacol. Res. Perspect. – 2018. – Т. 6, № 6. – С. e00447.

41. Wan R., Bai R., Shi Y. Molecular choreography of pre-mRNA splicing by the spliceosome // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2019. – Т. 59. – С. 124–133.

42. Ratni H., Scalco R. S., Stephan A. H. Risdiplam, the First Approved Small Molecule Splicing Modifier Drug as a Blueprint for Future Transformative Medicines // ACS Med. Chem. Lett. – 2021. – Т. 12, № 6. – С. 874–877.

43. Campagne S., Boigner S., Rüdisser S.[и др.]. Structural basis of a small molecule targeting RNA for a specific splicing correction // Nat. Chem. Biol. – 2019. – Т. 15, № 12. – С. 1191–1198.

44. Sivaramakrishnan M., McCarthy K. D., Campagne S.[и др.]. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers // Nat. Commun. – 2017. – Т. 8, № 1. – С. 1476.

45. Baranello G., Darras B. T., Day J. W.[и др.]. Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy // N. Engl. J. Med. – 2021. – Т. 384, № 10. – С. 915–923.

46. Paik J. Risdiplam: A Review in Spinal Muscular Atrophy // CNS Drugs. – 2022. – Т. 36, № 4. – С. 401–410.

47. Mercuri E., Deconinck N., Mazzone E. S.[и др.]. Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2):

a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial // Lancet Neurol. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 42–52.

48. Chiriboga C. A., Bruno C., Duong T.[и др.]. Risdiplam in Patients Previously Treated with Other Therapies for Spinal Muscular Atrophy: An Interim Analysis from the JEWELFISH Study // Neurol. Ther. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 543–557.

49. Chiriboga C. A., Bruno C., Duong T.[и др.]. JEWELFISH: 24-month results from an open-label study in non-treatment-naïve patients with SMA receiving treatment with risdiplam // J. Neurol. – 2024. – Т. 271, № 8. – С. 4871–4884.

50. Finkel R. S., Al-Muhaizea M., Farrar M. A.[и др.]. RAINBOWFISH: A Study of Risdiplam in Newborns with Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy (SMA) (4281) // Neurology. – 2021. – Т. 96, № 15_supplement. – С. 4281.

51. Finkel R. S., Farrar M. A., Vlodavets D.[и др.]. RAINBOWFISH: Preliminary Efficacy and Safety Data in Risdiplam-Treated Infants with Presymptomatic SMA (P17-5.003) // Neurology. – 2022. – Т. 98, № 18_supplement. – С. 1636.

52. Servais L., Farrar M., Finkel R.[и др.]. RAINBOWFISH: Primary Efficacy and Safety Data in Risdiplam-treated Infants with Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy (SMA) (S37.006) // Neurology. – 2024. – Т. 102, № 7_supplement_1. – С. 5269.

53. Keritam O., Erdler M., Fasching B.[и др.]. Efficacy and safety of risdiplam in adults with 5q-associated spinal muscular atrophy: a nationwide observational cohort study in Austria // eClinicalMedicine. – 2025. – Т. 88. – С. 103536.

54. Cortes J. E., Kantarjian H., Shah N. P.[и др.]. Ponatinib in Refractory Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias // N. Engl. J. Med. – 2012. – Т. 367, № 22. – С. 2075–2088.

55. Hartz R. A., Ahuja V. T., Sivaprakasam P.[и др.]. Design, Structure–Activity Relationships, and In Vivo Evaluation of Potent and Brain-Penetrant Imidazo[1,2- *b*]pyridazines as Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β) Inhibitors // J. Med. Chem. – 2023. – Т. 66, № 6. – С. 4231–4252.

56. Liu C., Lin J., Moslin R.[и др.]. Identification of Imidazo[1,2- *b*]pyridazine Derivatives as Potent, Selective, and Orally Active Tyk2 JH2 Inhibitors // ACS Med. Chem. Lett. – 2019. – Т. 10, № 3. – С. 383–388.

57. El Akkaoui A., Koubachi J., Guillaumet G., El Kazzouli S. Synthesis and Functionalization of Imidazo[1,2- *b*]Pyridazine by Means of Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions // ChemistrySelect. – 2021. – Т. 6, № 34. – С. 8985–9011.

58. Lucas M. C., Goldstein D. M., Hermann J. C.[и др.]. Rational Design of Highly Selective Spleen Tyrosine Kinase Inhibitors // J. Med. Chem. – 2012. – Т. 55, № 23. – С. 10414–10423.

59. Kawashima T., Iwamoto I., Nakagawa N.[и др.]. Inhibitory Effect of Pemirolast, a Novel Antiallergic Drug, on Leukotriene C4 and Granule Protein Release from Human Eosinophils // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2009. – С. 405–409.

60. Kennis L. E. J., Bischoff F. P., Mertens C. J.[и др.]. New 2-substituted 1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-c]pyridine having highly active and potent central α2-antagonistic activity as potential antidepressants // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2000. – Т. 10, № 1. – С. 71–74.

61. La Motta C., Sartini S., Mugnaini L.[и др.]. Pyrido[1,2- *a*]pyrimidin-4-one Derivatives as a Novel Class of Selective Aldose Reductase Inhibitors Exhibiting Antioxidant Activity // J. Med. Chem. – 2007. – Т. 50, № 20. – С. 4917–4927.

62. Mohammed E. U. R., Porter Z. J., Jennings I. G.[и др.]. Synthesis and biological evaluation of 4H-benzo[e][1,3]oxazin-4-ones analogues of TGX-221 as inhibitors of PI3Kβ // Bioorg. Med. Chem. – 2022. – Т. 69. – С. 116832.

63. Li A.-R., Johnson M. G., Liu J.[и др.]. Optimization of the heterocyclic core of the quinazolinone-derived CXCR3 antagonists // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 688–693.

64. Bhawale R. T., Chillal A. S., Kshirsagar U. A. 4 *H* -PYRIDO [1,2- *a*]pyrimidin-4-one, biologically important fused heterocyclic scaffold: Synthesis and functionalization // J. Heterocycl. Chem. – 2023. – Т. 60, № 8. – С. 1356–1373.

65. Moshnenko N., Kazantsev A., Chupakhin E.[и др.]. Synthetic Routes to Approved Drugs Containing a Spirocycle // Molecules. – 2023. – Т. 28, № 10. – С. 4209.

66. Hiesinger K., Dar'in D., Proschak E., Krasavin M. Spirocyclic Scaffolds in Medicinal Chemistry // J. Med. Chem. – 2021. – Т. 64, № 1. – С. 150–183.

67. Miyazaki M., Uoto K., Sugimoto Y.[и др.]. Discovery of DS-5272 as a promising candidate: A potent and orally active p53–MDM2 interaction inhibitor // Bioorg. Med. Chem. – 2015. – Т. 23, № 10. – С. 2360–2367.

68. Novakov I. A., Babushkin A. S., Yablokov A. S.[и др.]. Synthesis and structure—activity relationships of cyclopropane-containing analogs of pharmacologically active compounds // Russ. Chem. Bull. – 2018. – Т. 67, № 3. – С. 395–418.

69. Jiang Q., Dong J., Lei F.[и др.]. Strain-release driven spirocyclization of bicyclo[1.1.0]butanes: access to 6,7-diazaspiro[3.4]octanes // Chem. Sci. – 2025. – Т. 16, № 26. – С. 12189–12195.

70. Патент № WO2015173181A1. Compounds for treating spinal muscular atrophy : № PCT/EP2015/060343 : заявлено 11.05.2015 : опубликовано 19.11.2015 / H. Ratni, L. Green, N. A. Naryshkin, M. L. Weetall.

71. «Process for the preparation of Risdiplam and its intermediates» by Srinivasan Thirumalai Rajan; Sajja Eswaraiah; Vijayavitthal T. Mathad; Ismail; Subuddhi Praveen; MSN Laboratories Private Limited, R&D Center, Hyderabad. URL: https://www.tdcommons.org/dpubs_series/5296/ (дата обращения: 30.08.2026).

72. Патент № WO2024003798A1. A Novel Process for the Preparation of 7-(4,7-Diazaspiro[2.5]octan-7-yl)-2-(2,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl)pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one with Novel Intermediates : опубликовано 04.01.2024 / K. K. Kothakonda, B. R. Pitta, S. B. Namana[и др.].

73. Патент № WO2022194909A2. Process for Preparing Risdiplam : опубликовано 22.09.2022 / J.-M. Adam, C. Pfleger, G. Wuitschik.

74. Патент № WO2024069646A1. Improved Process for the Preparation of Risdiplam and Its Intermediates : заявлено 25.09.2023 : опубликовано 04.04.2024 / S. Kandula, R. K. Yadlapalli, B. B. Vipparla[и др.].

75. Moessner C., Hoffmann-Emery F., Adam J.-M.[и др.]. Development and Optimization of the Manufacturing Process for RNA-Splicing Modifier Risdiplam RG7916 // Complete Accounts of Integrated Drug Discovery and Development: Recent Examples from the Pharmaceutical Industry. Volume 4. American Chemical Society. Т. 1423. С. 301–332.

76. Патент № WO2020079203A1. New Forms of Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one Derivatives, Their Formulation and Process of Making : № PCT/EP2019/078313 : заявлено 18.10.2019 : опубликовано 23.04.2020 / R. Meier, U. Schwitter, A. De Paepe[и др.].

77. Патент № WO2024236590A1. Novel Crystalline Form of Risdiplam and Process for Preparation Thereof : № PCT/IN2024/050457 : заявлено 30.04.2024 : опубликовано 21.11.2024 / N. S. Pradhan, V. R. Telange, Y. S. Sonar[и др.].

78. Патент № WO2022162107A1. Crystalline Form of Risdiplam : опубликовано 04.08.2022 / H. Lengauer.

79. Патент № WO2021021775A1. Solid State Forms of Risdiplam and Process for Preparation Thereof : опубликовано 04.02.2021 / S. Matečić Mušanić, D. Klarić, M. Kolenić.

80. Hoang G. L., Zoll A. J., Ellman J. A. Three-Component Coupling of Aldehydes, 2-Aminopyridines, and Diazo Esters via Rhodium(III)-Catalyzed Imidoyl C–H Activation: Synthesis of Pyrido[1,2- *a*]pyrimidin-4-ones // Org. Lett. – 2019. – Т. 21, № 11. – С. 3886–3890.

81. Le G., Vandegraaff N., Rhodes D. I.[и др.]. Discovery of potent HIV integrase inhibitors active against raltegravir resistant viruses // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2010. – Т. 20, № 17. – С. 5013–5018.

82. Патент № CN114853753B. Pyrido[1,2-a]pyrimidinone Analogs and Their Use in the Preparation of FGFR Inhibitors : № CN202210417741.4A : заявлено 20.04.2022 : опубликовано 09.05.2023 / L. Yu.

83. Jones E. D., Vandegraaff N., Le G.[и др.]. Design of a series of bicyclic HIV-1 integrase inhibitors. Part 1: Selection of the scaffold // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2010. – Т. 20, № 19. – С. 5913–5917.

84. Патент № CN119504737A. Synthesis Method of Risdiplam and Its Intermediates : № CN202311011948.2A : заявлено 11.08.2023 : опубликовано 25.02.2025 / J. Fang, W. Guo, J. Dong[и др.].

85. Патент № US9586955B2. Compounds for Treating Spinal Muscular Atrophy : № US14/377531 : заявлено 08.02.2013 : опубликовано 07.03.2017 / H. Qi, S. Choi, A. Dakka[и др.].

86. Woll M. G., Qi H., Turpoff A.[и др.]. Discovery and Optimization of Small Molecule Splicing Modifiers of Survival Motor Neuron 2 as a Treatment for Spinal Muscular Atrophy // J. Med. Chem. – 2016. – Т. 59, № 13. – С. 6070–6085.

87. Патент № WO2015024876A1. Screening Method : опубликовано 26.02.2015 / M. Ebeling, F. Metzger, M. Sivaramakrishnan.

88. Ratni H., Karp G. M., Weetall M.[и др.]. Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy // J. Med. Chem. – 2016. – Т. 59, № 13. – С. 6086–6100.

89. Патент № WO2024154148A1. Process for Preparation of Risdiplam, Novel Intermediates, and Process for Preparation Thereof : опубликовано 25.07.2024 / H. S. Minhas, G. S. Minhas, N. S. Pradhan[и др.].

90. Патент № WO2013119916A2. Compounds for Treating Spinal Muscular Atrophy : № PCT/US2013/025292 : заявлено 08.02.2013 : опубликовано 15.08.2013 / H. Qi, S. Choi, A. Dakka[и др.].

91. Патент № WO2016184832A1. Compounds for Treating Spinal Muscular Atrophy : опубликовано 24.11.2016 / R. J. Gillespie, H. Ratni, J. C. Sarie.

92. Патент № WO2011070811A1. Flavor-Improving Agent : опубликовано 16.06.2011 / A. Suenaga, Y. Tajima, A. Otsuka[и др.].

93. Roma G., Cinone N., Di Braccio M.[и др.]. Synthesis, antiplatelet activity and comparative molecular field analysis of substituted 2-amino-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-ones, their congeners and isosteric analogues // Bioorg. Med. Chem. – 2000. – Т. 8, № 4. – С. 751–768.

94. Патент № US9868737B2. Pyridino[1,2-a]pyrimidone Analogue Used as mTOR/PI3K Inhibitor : опубликовано 16.01.2018 / H. Guan, C. Wu, T. Yu[и др.].

95. Патент № WO2023180189A1. Mpro Targeting Antiviral Compounds : опубликовано 28.09.2023 / S. Richards, M. Derudas, N. Ahlsten, K. Papachristos.

96. Патент № US20230143612A1. Substituted 1,1'-Biphenyl Compounds and Methods Using Same : опубликовано 11.05.2023 / V. Ahuja, Y. Bi, A. G. Cole[и др.].

97. Gaube G., Mutter J., Leitch D. C. A "neat" synthesis of substituted 2-hydroxy-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-ones // Can. J. Chem. – 2024. – Т. 102, № 4. – С. 206–213.

98. Патент № WO2015192761A1. Pyridino[1,2-a]pyrimidone Analogue Used as mTOR/PI3K Inhibitor : опубликовано 23.12.2015 / H. Guan, C. Wu, T. Yu[и др.].

99. Патент № WO2015192760A1. Pyridino[1,2-a]pyrimidone Analogue Used as PI3K Inhibitor : опубликовано 23.12.2015 / C. Wu, T. Yu, S. Chen.

100. Yalduz S., Sarı S., Yılmaz M. Microwave assisted synthesis, acetylcholinesterase inhibition and molecular docking studies of furo[2,3- *d*]pyrido[1,2- *a*]pyrimidin-4-one derivatives // J. Heterocycl. Chem. – 2024. – Т. 61, № 10. – С. 1517–1530.

101. Park D.-S., Jo E., Choi J.[и др.]. Characterization and structure-activity relationship study of iminodipyridinopyrimidines as novel hepatitis C virus inhibitor // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – Т. 140. – С. 65–73.

102.Патент № WO2019057740A1. Process for the Preparation of 7-(4,7-Diazaspiro[2.5]octan-7-yl)-2-(2,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl)pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one Derivatives : № PCT/EP2018/075282 : заявлено 19.09.2018 : опубликовано 28.03.2019 / J.-M. Adam, S. M. Fantasia, D. V. Fishlock[и др.].

103.Патент № WO2017081111A1. Compounds for Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis : № PCT/EP2016/077190 : заявлено 10.11.2016 : опубликовано 18.05.2017 / K. D. McCarthy, F. Metzger, H. Ratni.

104.Патент № WO2020005882A1. Heteroaryl Compounds for Treating Huntington’s Disease : опубликовано 02.01.2020 / G. Chen, A. Bhattacharyya, Y. Jiang[и др.].

105.Патент № WO2022194802A1. New Thiadiazolopyrimidone Derivatives : № PCT/EP2022/056587 : заявлено 15.03.2022 : опубликовано 22.09.2022 / C. Dolente, N. Grether, F. S. O’Hara[и др.].

106.Патент № WO2023097007A1. Compounds and Methods for Modulating Splicing : № PCT/US2022/050914 : заявлено 23.11.2022 : опубликовано 01.06.2023 / D. Reynolds, M. W. Seiler, A. A. Agrawal[и др.].

107.Патент № WO2018226622A1. Compounds for Treating Huntington’s Disease : № PCT/US2018/035954 : заявлено 05.06.2018 : опубликовано 13.12.2018 / M. G. Woll, L. Amedzo, S. Babu[и др.].

108.Патент № WO2023034811A1. Compounds and Methods for Modulating Splicing : № PCT/US2022/075683 : заявлено 30.08.2022 : опубликовано 09.03.2023 / D. Reynolds, M. W. Seiler, A. A. Agrawal[и др.].

109.Патент № WO2023092149A1. Heterocyclic Substituted 1,3,4-thiadiazole and Pyridazine Compounds and Methods of Using the Same : № PCT/US2022/080352 : заявлено 22.11.2022 : опубликовано 25.05.2023 / T. T. Wager, Z. Weng, H. S. Xi.

110.Патент № WO2021207554A1. Compounds and Methods for Modulating Splicing : № PCT/US2021/026481 : заявлено 08.04.2021 : опубликовано 14.10.2021 / D. Reynolds, S. Leger, M. W. Seiler[и др.].

111.Патент № WO2023064880A1. Compounds and Methods for Modulating Nucleic Acid Splicing : № PCT/US2022/078081 : заявлено 13.10.2022 : опубликовано 20.04.2023 / D. Reynolds, M. W. Seiler, A. A. Agrawal[и др.].

112.Xing Q., Chandrachud P. P., Tillett K., Lopchuk J. M. Regioselective hydroamination of unactivated olefins with diazirines as a diversifiable nitrogen source // Nat. Commun. – 2024. – Т. 15, № 1. – С. 6049.

113.Pollak A., Stanovnik B., Tišler M. Synthesis of pyridazine derivatives—XVI // Tetrahedron. – 1968. – Т. 24, № 6. – С. 2623–2629.

114.Патент № WO2003061388A1. Fused Heterocyclic Sulfonylurea Compound, Herbicide Containing the Same, and Method of Controlling Weed with the Same : опубликовано 31.07.2003 / Y. Tanaka, Y. Kajiwara, M. Noguchi[и др.].

115.Патент № WO2010018327A1. 2-Alkyl-6-Cycloamino-3-(pyridin-4-yl)imidazo[1,2-b]pyridazine Derivatives, Preparation Thereof, and Therapeutic Application Thereof : опубликовано 18.02.2010 / A. Almario Garcia, P. Burnier, S. Cote-Des Combes[и др.].

116.Jacobson R. M., Raths R. A., McDonald J. H. 2-Methoxyallyl bromide. A superior acetonyl alkylating agent // J. Org. Chem. – 1977. – Т. 42, № 15. – С. 2545–2549.

117.Патент № WO2015048245A1. Imidazopyridazines Useful as Inhibitors of the PAR-2 Signaling Pathway : опубликовано 02.04.2015 / L. J. Farmer, P.-A. Fournier, S. Lessard[и др.].

118.Патент № WO2020224568A1. CDK Inhibitors : опубликовано 12.11.2020 / Z. Hu, H. He, F. Zhang[и др.].

119.Патент № CN116947865A. Synthesis Method of Risdiplam Intermediate and Risdiplam Intermediate : № CN202311011783.9A : заявлено 11.08.2023 : опубликовано 27.10.2023 / J. Dong, W. Fang, W. Guo[и др.].

120.Патент № CN105111201A. 5-Methyl-2-(pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one Compounds : № CN201410548970.5A : заявлено 16.10.2014 : опубликовано 02.12.2015 / Y. Jiang.

121.Патент № WO2023202501A1. Substituted Pyridopyrimidinone Compound, Composition Comprising Same, and Use Thereof : № PCT/CN2023/088563 : заявлено 17.04.2023 : опубликовано 26.10.2023 / Y. Wang, J. Zhao.

122.Патент № CN117050096A. Preparation Method of Risdiplam : № CN202310874292.0A : заявлено 17.07.2023 : опубликовано 14.11.2023 / J. Xu, Z. Han, K. Li[и др.].

123.Патент № WO2022206924A1. Nitrogen-Containing Tricyclic Bifunctional Compound, Preparation Method Therefor, and Application Thereof : № PCT/CN2022/084627 : заявлено 31.03.2022 : опубликовано 06.10.2022 / L. Wu, X. You, L. Zhao[и др.].

124.Патент № KR20210156400A. Compounds for Inhibiting CDK and Medical Use Thereof : № KR1020200073912A : заявлено 17.06.2020 : опубликовано 27.12.2021 / M. Kim, J. S. Kim, H. C. Ryu[и др.].

125.Патент № WO2025036129A1. Method for Synthesizing Risdiplam Intermediate and Risdiplam Intermediate : опубликовано 20.02.2025 / J. Dong, W. Fang, W. Guo[и др.].

126.Zhu Y., Back T. G. Preparation of 1,7- and 3,9-Dideazapurines from 2-Amino-3-iodo- and 3-Amino-4-iodopyridines and Activated Acetylenes by Conjugate Addition and Copper-Catalyzed Intramolecular Arylation // J. Org. Chem. – 2014. – Т. 79, № 22. – С. 11270–11276.

127.Chen Z., Wen Y., Ding H.[и др.]. Silver-catalyzed highly efficient synthesis of pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-ones from 2-aminopyridines and alkynoates // Tetrahedron Lett. – 2017. – Т. 58, № 1. – С. 13–16.

128.Hussain M., Liu J. Practical synthesis of 4H-pyrido[1, 2-a]pyrimidin-4-ones using ethylene glycol as a promoting solvent // Tetrahedron Lett. – 2020. – Т. 61, № 36. – С. 152269.

129.McMillan F. H., Kun K. A., McMillan C. B.[и др.]. Hydrazides of Some Pyridazonyl Substituted Acids // J. Am. Chem. Soc. – 1956. – Т. 78, № 2. – С. 407–410.

130.Rios A. C., Bera P. P., Moreno J. A., Cooper G. Pyruvate Aldol Condensation Product: A Metabolite That Escaped Synthetic Preparation for Over a Century // ACS Omega. – 2020. – Т. 5, № 25. – С. 15063–15068.

131.Ulomskii E. N., Shestakova T. S., Deev S. L.[и др.]. A new approach to the synthesis of lamotrigine and other 3,5-diamino-1,2,4-triazine derivatives // Russ. Chem. Bull. – 2005. – Т. 54, № 3. – С. 726–732.

132.Saputra M. A., Ngo L., Kartika R. Synthesis of Vinyl Chlorides via Triphosgene–Pyridine Activation of Ketones // J. Org. Chem. – 2015. – Т. 80, № 17. – С. 8815–8820.

133.Mo B., Chen C., Peng J. CuI-catalyzed synthesis of multisubstituted pyrido[1,2- *a*]pyrimidin-4-ones through tandem Ullmann-type C–N cross-coupling and intramolecular amidation reaction // RSC Adv. – 2023. – Т. 13, № 35. – С. 24264–24271.

134.Averin A. D., Panchenko S. P., Murashkina A. V.[и др.]. Recent Achievements in the Copper-Catalyzed Arylation of Adamantane-Containing Amines, Di- and Polyamines // Catalysts. – 2023. – Т. 13, № 5. – С. 831.

135.Averin A. D., Abel A. S., Grigorova O. K.[и др.]. Recent achievements in copper catalysis for C–N bond formation // Pure Appl. Chem. – 2020. – Т. 92, № 8. – С. 1181–1199.

136.Perrin D. D., Douglas D. Purification of laboratory chemicals. Oxford, New York, Pergamon Press, 1966. 382 с.