

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991161 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.12.08

(51) Int. Cl. C07D 498/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/5365 (2006.01)

(54) 7-ФЕНИЛЭТИЛАМИНО-4Н-ПИРИМИДО[4,5-D][1,3]ОКСАЗИН-2-ОНОВЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ МУТАНТНЫХ IDH1 И IDH2

(31) 62/435,283

(32) 2016.12.16

(33) US

(86) PCT/US2017/065246

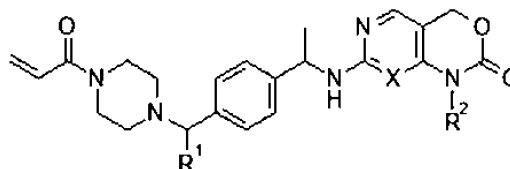
(87) WO 2018/111707 2018.06.21

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Бауэр Ренато Алехандро, Буле Серж
Луи, Беркхолдер Тимоти Пол, Гилмор
Реймонд, Хан Патрик Джеймс,
Ранкович Зоран (US)

(74) Представитель:
Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

(57) Предложены соединение, такое как определе-
но в настоящем документе, или фармацевтическая
композиция, содержащая соединение, для приме-
нения в лечении рака, включающего мутантную
IDH1 или мутантную IDH2, имеющее структуру



201991161

A1

A1

201991161

7-ФЕНИЛЭТИЛАМИНО-4Н-ПИРИМИДО[4,5-D][1,3]ОКСАЗИН-2-ОНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ МУТАНТНЫХ IDH1 И IDH2

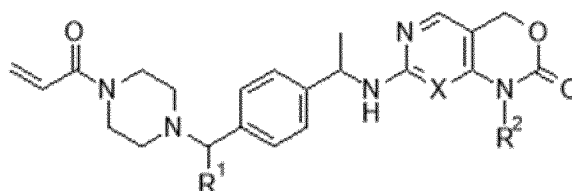
Белок изоцитратдегидрогеназа (IDH) является важным ферментом в цикле лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот или Кребса). Цикл лимонной кислоты имеет важнейшее значение для многих биохимических путей и является одним из первых выявленных компонентов клеточного метаболизма.

Изоцитратдегидрогеназы катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата до α -кетоглутарата (2-оксоглутарата). Эти ферменты принадлежат к двум отдельным подклассам, в одном из которых акцептором электронов является никотинамидадениндинуклеотид (НАД(+)), а в другом - никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ(+)). У млекопитающих были описаны три изоцитратдегидрогеназы: одна НАД(+)-зависимая изоцитратдегидрогеназа, мультисубъединичный фермент, локализованный в митохондриальном матриксе, и две НАДФ(+)-зависимые изоцитратдегидрогеназы, одна из которых является митохондриальной, а другая преимущественно цитозольной. Каждый НАДФ(+)-зависимый изофермент является димером. Белок, кодируемый геном IDH1, представляет собой НАДФ(+)-зависимую изоцитратдегидрогеназу, присутствующую в цитоплазме и пероксисомах. Цитоплазматический фермент играет значительную роль при выработке цитоплазматического НАДФН. IDH1 экспрессируется у широкого спектра видов и организмов, у которых отсутствует полный цикл лимонной кислоты.

Недавно мутации IDH1 и родственной изоформы IDH2 были обнаружены при нескольких типах рака. Было обнаружено, что мутации возникают в специфических аминокислотах последовательности белка и экспрессируются гетерозиготно, что приводит к приобретению функции. Указанные мутации возникают в функционально консервативных остатках, и в биохимических исследованиях мутантных форм IDH1 и IDH2 была продемонстрирована утрата нормальной функции, обратимой конверсии изоцитрата в α -кетоглутарат. В результате этих мутаций появляется возможность новой (или неоморфной) конверсии α -кетоглутарата (α KG) в 2-гидроксиглутарат (2HG). В результате в раковых клетках, которые содержат мутантные формы IDH1 или IDH2, образуются существенно более высокие концентрации 2HG. Высокий уровень 2HG приводит к блокированию дифференцировки клеток, которое может быть обращено вспять путем ингибирования мутантных IDH1 или IDH2.

В заявке PCT/US2016/043264 описаны ковалентные ингибиторы мутантной IDH1. Также существует потребность в соединениях, которые селективно ингибируют мутантный фермент IDH1 и IDH2, для лечения различных видов рака. Также существует потребность в соединениях, которые селективно ингибируют мутантные ферменты IDH1 и IDH2, имеющие неоморфную активность по сравнению с IDH1 и IDH2 дикого типа, для лечения различных видов рака. В настоящем изобретении предложены соединения формулы I или Ia, которые являются ингибиторами мутантных IDH1 и IDH2. Соединения формулы I или Ia являются ковалентными ингибиторами, которые селективно ингибируют мутантные IDH1 и IDH2.

Согласно одному из аспектов изобретения предложены соединения-ингибиторы мутантных ферментов IDH1 и IDH2 формулы:



I

где:

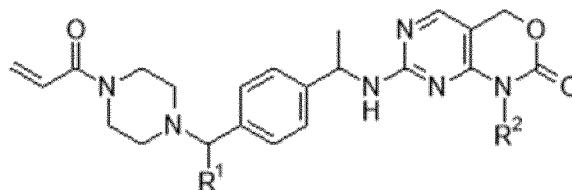
R¹ представляет собой -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃ или -CH₂-циклопропил;

R² представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃;

X представляет собой N или CH; или

их фармацевтически приемлемые соли.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложены соединения-ингибиторы мутантных ферментов IDH1 и IDH2 формулы:



Ia

где

R¹ представляет собой -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃ или -CH₂-циклопропил;

R² представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; или

их фармацевтически приемлемые соли.

5 Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено соединение формулы I или Ia, которое представляет собой:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

10 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1;

1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2;

15 или фармацевтически приемлемая соль любого из указанных соединений.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой соединение формулы I или Ia, которое представляет собой 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль.

20 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение-ингибитор мутантной IDH1 формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, 25 который представляет собой глиому, глиобластому, мультиформную глиобластому, астроцитому, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, 30 хондросаркому или холангиокарциному, у пациента, включающий введение пациенту,

нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли.

5 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому или глиобластому, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли.

10 Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который
15 представляет собой глиому, глиобластому, мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоимунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, хондросаркому или
20 холангиокарциному.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому
25 или глиобластому.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой глиому, глиобластому,
30 мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоимунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-

ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, хондросаркому или холангиокарциному.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено применение соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому или глиобластому.

Термин «пациент» обозначает млекопитающее, а «млекопитающее» включает, но не ограничивается им, человека.

«Терапевтически эффективное количество» обозначает дозировку соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей соединение или его фармацевтически приемлемую соль, которая требуется для ингибирования мутантной IDH1 или мутантной IDH2 у пациента с раком, что приводит к снятию блокирования дифференцировки и возникающему в его результате подавлению роста опухолевых клеток и устранению или замедлению или блокировке прогрессирования рака у пациента. Предполагаемые дозировки соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли находятся в диапазоне от 1 мг/пациент/день до 2000 мг/пациент/день. Предполагается, что предпочтительные дозировки находятся в диапазоне от 5 мг/пациент/день до 1800 мг/пациент/день. Предполагается, что наиболее предпочтительные дозировки находятся в диапазоне от 40 мг/пациент/день до 1600 мг/пациент/день. Точная дозировка, необходимая для лечения пациента, и продолжительность лечения определяются лечащим врачом с учетом стадии и тяжести заболевания, а также конкретных потребностей и ответа конкретного пациента. Несмотря на то, что дозировка указывается в расчете на день, введение можно регулировать для обеспечения более оптимального терапевтического благоприятного действия у пациента, а также для сдерживания или уменьшения токсичности, вызванной лекарственным средством. Помимо ежедневного введения может быть уместным введение два раза в день (BID); введение три раза в день (TID); введение через день (Q2D); введение через день в течение пяти дней, а затем два дня без введения (TIW); или введение раз в три дня (Q3D).

Термины «способ лечения», «лечить» и «лечение» включают полный спектр способов вмешательства при раке, от которого страдает пациент, таких как введение активного соединения для облегчения, замедления или обращения вспять одного или

более симптомов или задержки прогрессирования рака, даже если рак фактически не устраняется.

Термин $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ обозначает 2-метилпропил, термин $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ обозначает 2-метоксиэтил, и термин $-\text{CH}_2$ -циклопропил обозначает циклопропилметил.

5 Соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемую соль предпочтительно получают в виде фармацевтической композиции с использованием фармацевтически приемлемого носителя и вводят различными способами. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Указанные фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в
10 данной области техники. См., например, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, L.V. Allen, редактор, 22^е издание, Pharmaceutical Press, 2012.

В конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит 7-
{[(1S)-1-{4-[(1S)-1-(4-акрилоилпиперазин-1-ил)-2-циклопропилэтил]фенил}этил]амино}-
1-этил-1,4-дигидро-2H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он или его фармацевтически
15 приемлемую соль совместно с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно другими терапевтическими ингредиентами, предназначенными для лечения рака в целом или конкретного типа рака.

Соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить одновременно или до или после введения одного или более других
20 терапевтических агентов. Соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемую соль, если его вводят совместно с одним или более другими терапевтическими агентами, можно вводить отдельно при помощи такого же или отличающегося способа введения или совместно с другим(-и) терапевтическим(-и) агентом(-ами) в одной фармацевтической композиции. Если вводят один или более
25 дополнительных терапевтических агентов, то введение каждого терапевтического агента можно проводить одновременно, отдельно или последовательно.

Соединение формулы I или Ia может взаимодействовать с рядом неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты. Указанные фармацевтически приемлемые соли и общая методика их получения
30 хорошо известны в данной области техники. См., например, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts, "Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Соединение формулы Ia или его фармацевтически приемлемая соль может быть получено различными способами, известными в данной области, а также способами, описанными ниже. Конкретные стадии синтеза можно объединять в другом порядке для получения соединения формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемой соли.

5 Кроме того, определенные промежуточные соединения, описанные в последующих примерах получения, могут содержать одну или более азот-защитных групп. Следует понимать, что защитные группы могут быть различными, что известно специалистам в данной области техники, в зависимости от конкретных реакционных условий и конкретных проводимых превращений. Условия введения и удаления защитных групп
10 хорошо известны специалистам и описаны в литературе (см., например, “*Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*”, пятое издание, Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2014).

Названия соединений формулы I или Ia указаны в соответствии с IUPAC и также могут быть указаны в соответствии с CAS, также могут использоваться другие названия,
15 которые позволяют однозначно идентифицировать соединение формулы I или Ia или его фармацевтически приемлемую соль.

Следует понимать, что соединение формулы I или Ia может быть изображено в виде отдельного стереоизомера. Два присутствующих хиральных центра определяют наличие четырех диастереомеров. Предполагается, что при использовании в настоящем
20 документе описание отдельного стереоизомера также включает смеси стереоизомеров, включая указанное при помощи названия или изображенное соединение формулы I или Ia. В настоящем документе для описания конкретных стереоизомеров могут использоваться обозначения (R)- и (S)- в соответствии с правилом Кана-Ингольда-Прелога. Конкретные стереоизомеры могут быть получены в рамках стереоспецифического синтеза с
25 использованием энантимерно чистых или обогащенных исходных веществ. Конкретные стереоизомеры исходных веществ, промежуточных соединений или рацемических смесей, включая соединения формулы I или Ia, можно разделять способами, хорошо известными в данной области техники, такими как те, что описаны в Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) и Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), включая хроматографию на
30 хиральных неподвижных фазах, ферментативное разделение или фракционную кристаллизацию или хроматографию специально полученных для этого диастереомеров, таких как диастереомерные соли. В случае соединений формулы I или Ia, имеющих конфигурацию, для которой указаны все стереоцентры, «по существу энантимерно

чистый» означает, что изомерная чистота соответствует энантиомерному избытку более 90%. В другом варианте реализации изомерная чистота соединения формулы I или Ia соответствует энантиомерному избытку более 95%. В другом варианте реализации изомерная чистота соединения формулы I или Ia соответствует энантиомерному избытку более 98%. В еще одном варианте реализации изомерная чистота соединения формулы I или Ia соответствует энантиомерному избытку более 99%. Все стереоизомеры по отдельности, а также диастереомерные смеси соединений формулы I или Ia включены в объем настоящего изобретения. Обозначения «изомер 1» и «изомер 2» и «диастереомер 1» и «диастереомер 2» относятся к соединениям, которые элюируются при хиральной хроматографии первым и вторым, соответственно, и если хиральную хроматографию проводят на ранней стадии синтеза, то такое же обозначение применяют к последующим промежуточным соединениям и примерам.

Соединения, применяемые в качестве исходных веществ при синтезе соединений формулы I или Ia, хорошо известны, и если они не являются коммерчески доступными, то могут быть легко получены согласно конкретным приведенным ссылкам, стандартными способами, обычно используемыми специалистами в данной области техники, или согласно описанию из общих справочных пособий.

Примеры известных процедур и способов включают те, что описаны в общих справочниках, таких как Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5^e издание, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4^e издание, часть B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, и т.д., а также по ссылкам, приведенным в указанных документах.

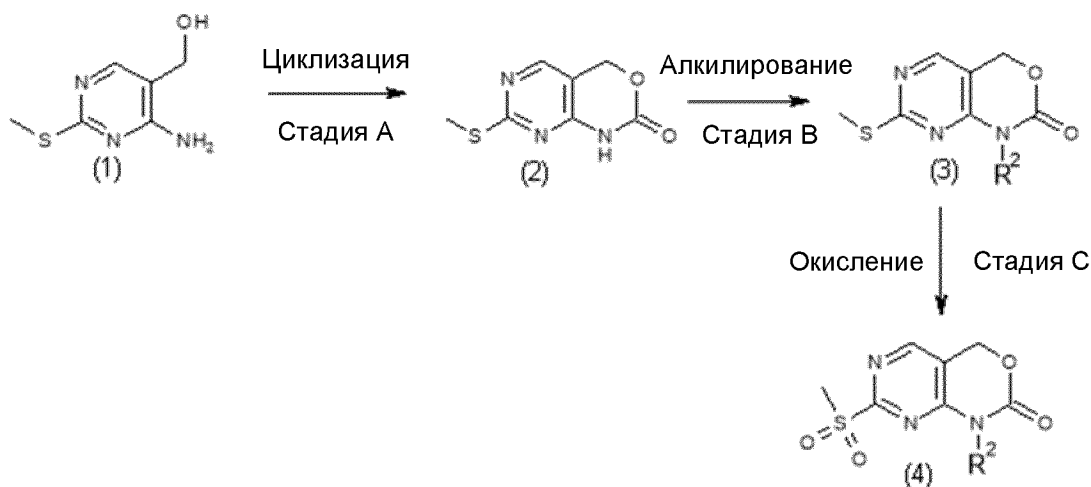
Определенные сокращения имеют следующие определения: “ACN” обозначает ацетонитрил; “αKG” обозначает альфа-кетоглутарат или 2-кетоглутарат; “alloc” обозначает аллилоксикарбонил; “ATCC” обозначает американскую коллекцию типовых культур; “BCA” обозначает бичинхониновую кислоту; “BSA” обозначает бычий сывороточный альбумин; “CDI” обозначает 1,1’-карбонилдиимидазол; “DCC” обозначает 1,3-дициклогексилкарбодиимид; “DXM” обозначает дихлорметан; “DEAD” обозначает диэтилазодикарбоксилат; “DIAD” обозначает диизопропилазодикарбоксилат; “DIC” обозначает диизопропилкарбодиимид; “DIPEA” обозначает диизопропилэтиламин или N-этил-N-изопропилпропан-2-амин; “DMAP” обозначает диметиламинопиридин; “ДМФ”

обозначает диметилформамид; “ДМСО” обозначает диметилсульфоксид; “DTT” обозначает дитиотреитол; “EDC” обозначает EDAC, EDCI или гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида; “ЭДТА” обозначает этилендиаминтетрауксусную кислоту; “ЭГТА” обозначает этиленгликольтетрауксусную кислоту; “EtOAc” обозначает этилацетат; “EtOH” обозначает этанол или этиловый спирт; “Пр.” обозначает пример; “НАТУ” обозначает гексафторфосфат (диметиламино)-N,N-диметил(3*H*-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-илокси)метанаминия; “НВТУ” обозначает гексафторфосфат 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия; “2HG” обозначает 2-гидроксиглутарат; “d₅-3HG” обозначает 3-гидрокси-1,5-пентандиовую-2,2,3,4,4-d₅ кислоту; “HPLC” обозначает жидкостную хроматографию гидрофильных взаимодействий; “НОAt” обозначает 1-гидрокси-7-азобензотриазол; “НОВt” обозначает гидрат 1-гидроксилбензотриазола; “ВЭЖХ” обозначает высокоэффективную жидкостную хроматографию; “IC₅₀” обозначает концентрацию агента, которая обеспечивает 50% от максимального ингибирующего ответа, возможного для данного агента; “мХПБК” обозначает *мета*-хлорпербензойную кислоту; “MeOH” обозначает метанол или метиловый спирт; “НАДФ⁺ и НАДФН” обозначает окисленную и восстановленную формы никотинамидадениндинуклеотид-фосфата, соответственно; “NMP” обозначает N-метил-2-пирролидон; “PG” обозначает защитную группу; “Пр.пол.” обозначает пример получения; “PyBOP” обозначает гексафторфосфат бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфония; “PyBop” обозначает гексафторфосфат бром-трис-пирролидинофосфония; “об./мин” обозначает обороты в минуту; “(R)-RUCY®-XylBINAP” обозначает RuCl[(R)-daipena][(R)-xylbinap]; “S_NAr” обозначает нуклеофильное ароматическое замещение; “ТЭА” обозначает триэтиламин; “ТФУК” обозначает трифторуксусную кислоту; “ТГФ” обозначает тетрагидрофуран; и “Tris” обозначает трис(гидроксиметил)аминометан.

Соединения формулы I или Ia или их фармацевтически приемлемые соли можно получать различными способами, известными в данной области техники, некоторые из которых проиллюстрированы ниже на схемах и в примерах получения и примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно объединять различным образом или объединять со стадиями из других схем для получения соединений Формулы I или Ia или их фармацевтически приемлемых солей. Продукты каждой стадии на приведенных ниже схемах можно выделять традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На следующих

схемах все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества легко доступны специалистам в данной области техники.

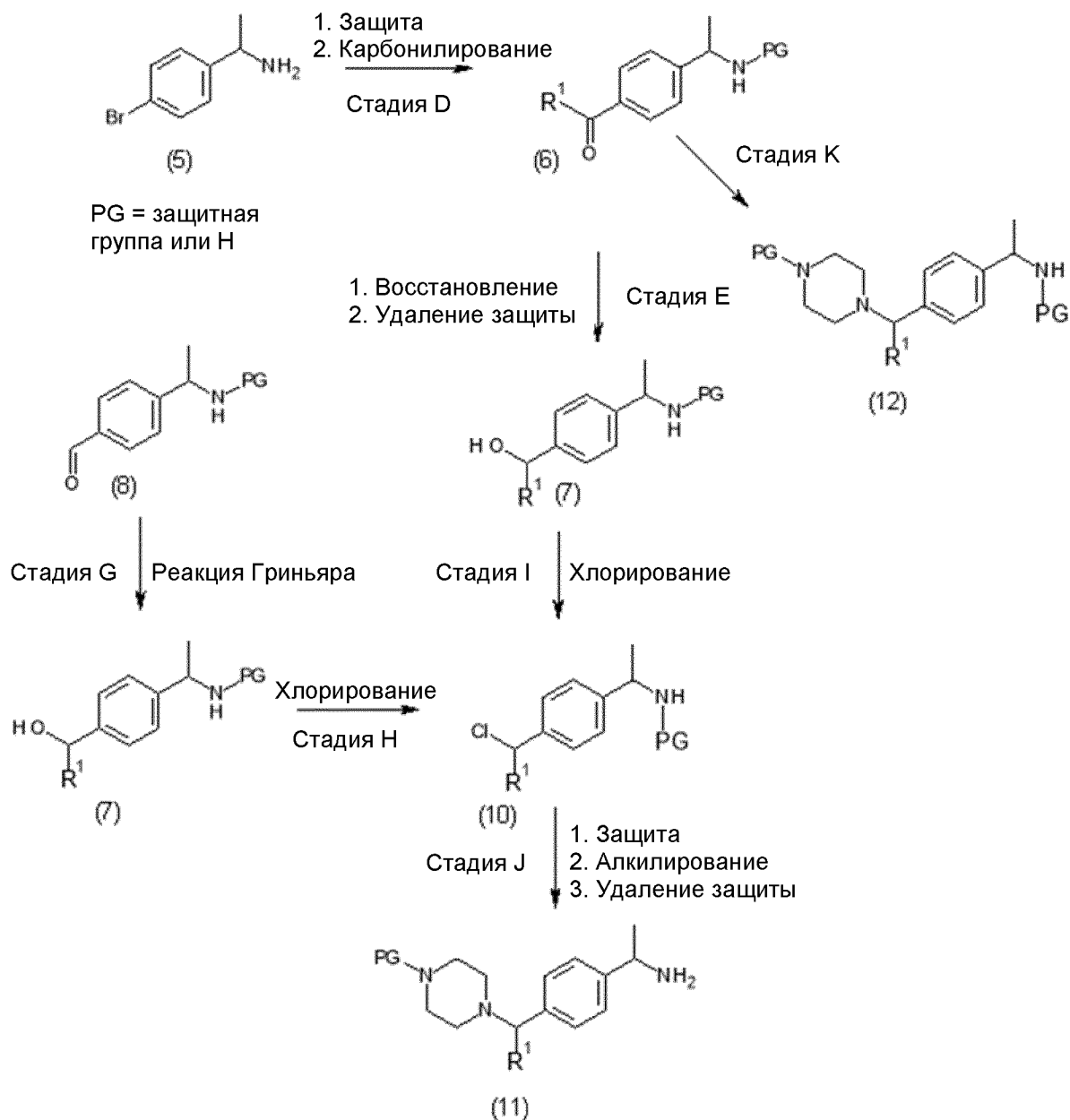
Схема 1



- 5 Согласно схеме 1 последовательность взаимодействий приводит к получению 1-замещенного 7-(метилсульфонил)-1,4-дигидро-2H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она, (4), продукта стадии С, где R² такой, как определено выше. «PG» представляет собой защитную группу, предназначенную для аминогруппы или кислородной группы, такую как карбаматы, амиды или сложные эфиры. Например, 5-гидроксиметил-4-амино-2-метилсульфанилпиримидин можно циклизовать в стандартных условиях карбамоилирования до образования оксазин-2-она с использованием трифосгена и органического основания, такого как DIPEA или ТЭА, при температуре от примерно -30 до -35°C с получением соединения (2), продукта стадии А. В качестве альтернативы, для проведения карбамоилирования вместо трифосгена можно применять карбонилдигалогенид или карбонил-ди-псевдогалогенид, такой как CDI, фосген или дифосген. Амин в оксазине можно алкилировать соответствующим замещенным алкилгалогенидом, таким как йодсодержащий реагент, в растворителе, таком как NMP, с использованием органического основания, такого как K₂CO₃, при температуре примерно 50-65°C с получением соединения (3), продукта стадии В. В качестве альтернативы можно проводить реакцию Мицунобу для алкилирования амина в оксазине с использованием соответствующего спирта, такого как MeOH. Реакции Мицунобу хорошо известны в данной области техники и могут обеспечивать конверсию гидроксильной группы в уходящую группу, которую заменяют разнообразными нуклеофилами, такими как карбамат, с использованием трифенилфосфина и азодикарбоксилата, такого как DIAD или DEAD, в растворителе, таком как ТГФ, с получением соединения (3). Сульфид можно окислять до сульфона в условиях, хорошо известных в данной области техники, таких как

использование мХПБК или пероксимоносульфата калия при температуре от примерно 10 до 25°C в растворителе, таком как АСН или ДХМ, с получением соединения (4), продукта стадии С.

Схема 2



5

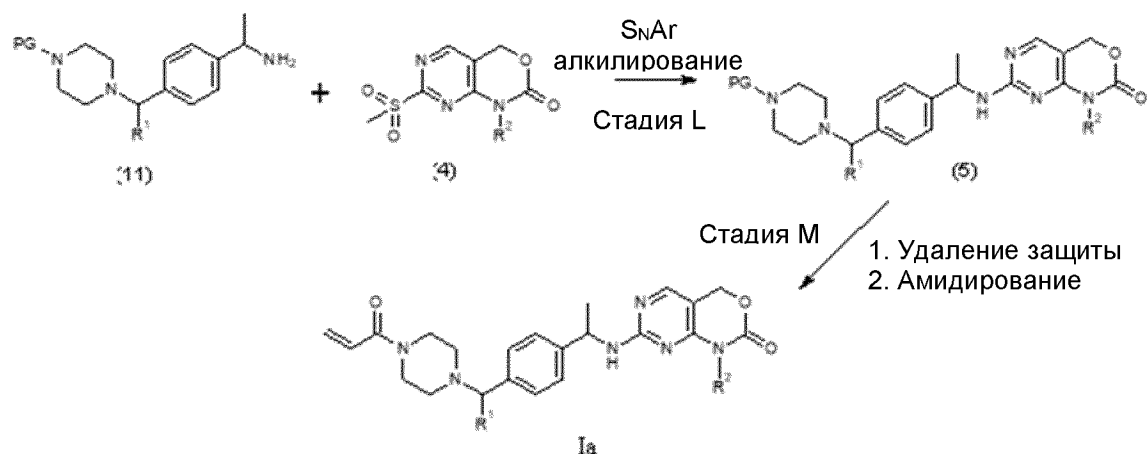
Согласно схеме 2 (4-(1-аминоэтил)фенил)метанол (7) можно получать за несколько стадий из арилгалогенида, такого как бромид (5), способами, хорошо известными специалистам. Можно проводить защиту амина на подстадии 1, стадия D, где “PG” представляет собой защитную группу, предназначенную для аминогруппы, такую как амид. Защищенный арилбромид (5) можно превращать в кетон в условиях карбонилирования с использованием лития с получением арилкетона (6) на подстадии 2, стадия D. Затем можно восстанавливать кетон с использованием восстановителя, такого

10

как боргидрид натрия, в растворителе, таком как MeOH, на подстадии 1, стадия E. Защиту амина можно удалять на указанной стадии (подстадия 2, стадия E) или позже во время синтеза с получением соединения (7). В качестве альтернативы, соединение (6) можно напрямую превращать в соединение (12) по реакции восстановительного аминирования с использованием изопропоксида титана (IV) в растворителе, таком как ТГФ, при нагревании примерно до 60°C и последующем охлаждении и добавлении MeOH и восстановителя, такого как цианоборгидрид натрия, с получением соединения (12). Соединение (7) можно превращать в бензилгалогенид, такой как хлорид, в стандартных условиях галогенирования с использованием галогенирующего агента, такого как тионилхлорид или POCl₃, в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединения (10), стадия I. При необходимости в соединение (10) можно вводить защитные группы и алкилировать на стадии J. Например, защитные группы в амине, (10), можно вводить на подстадии 1 стадии J с использованием защитных групп, таких как трифторацетил или CBZ. Такие защитные группы хорошо известны и изучены в данной области техники. В качестве альтернативы, соединение 10 можно получать из альдегида, соединения (8). Соединение (8) можно получать путем окисления соответствующего бензилового спирта в условиях с использованием периодинана Десса-Мартина в растворителе, таком как ДХМ, с получением альдегида (8). На стадии G можно проводить реакцию Гриньяра с использованием альдегида с получением соединения (7). Соединение (7), полученное на стадии G, можно хлорировать на стадии H с получением соединения (10), как обсуждалось выше для стадии I. Хлорид в соединении (10) можно заменять на монозащищенный пиперазин в рамках двухстадийного процесса, проводимого в одном реакторе. Защита 1-фенилэтиламина не всегда требуется, но если принято решение об использовании защитных групп, то предпочтительно следует использовать различные защитные группы для 1-фенилэтиламина и аминопиперазинового продукта (11), стадия J, подстадия 1, для селективного удаления той или иной PG на выбранной стадии. Например, можно проводить взаимодействие 1-фенилэтиламина с ангидридом трифторуксусной кислоты с использованием органического основания, такого как ТЭА, в растворителе, таком как ДХМ, при температуре примерно 0-5°C с получением защищенного амина-продукта на подстадии 1, стадия J. Специалисты в данной области техники смогут предложить другие защитные группы, которые можно применять для защиты амина, такие как CBZ. Затем можно проводить замену хлорида в условиях, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, галогенид можно заменять на защищенный или незащищенный пиперазин с использованием неорганического основания, такого как K₂CO₃, и KI или NaI, в качестве нуклеофильного

катализатора для ускорения взаимодействия. Смесь можно нагревать примерно до 60-80°C в растворителе, таком как ACN, с получением защищенного соединения (11) на подстадии 2, стадия J. Защитную группу в 1-фенилэтиламине можно удалять с использованием основания, такого как водный гидроксид калия, с получением соединения (11) на подстадии 3, стадия J.

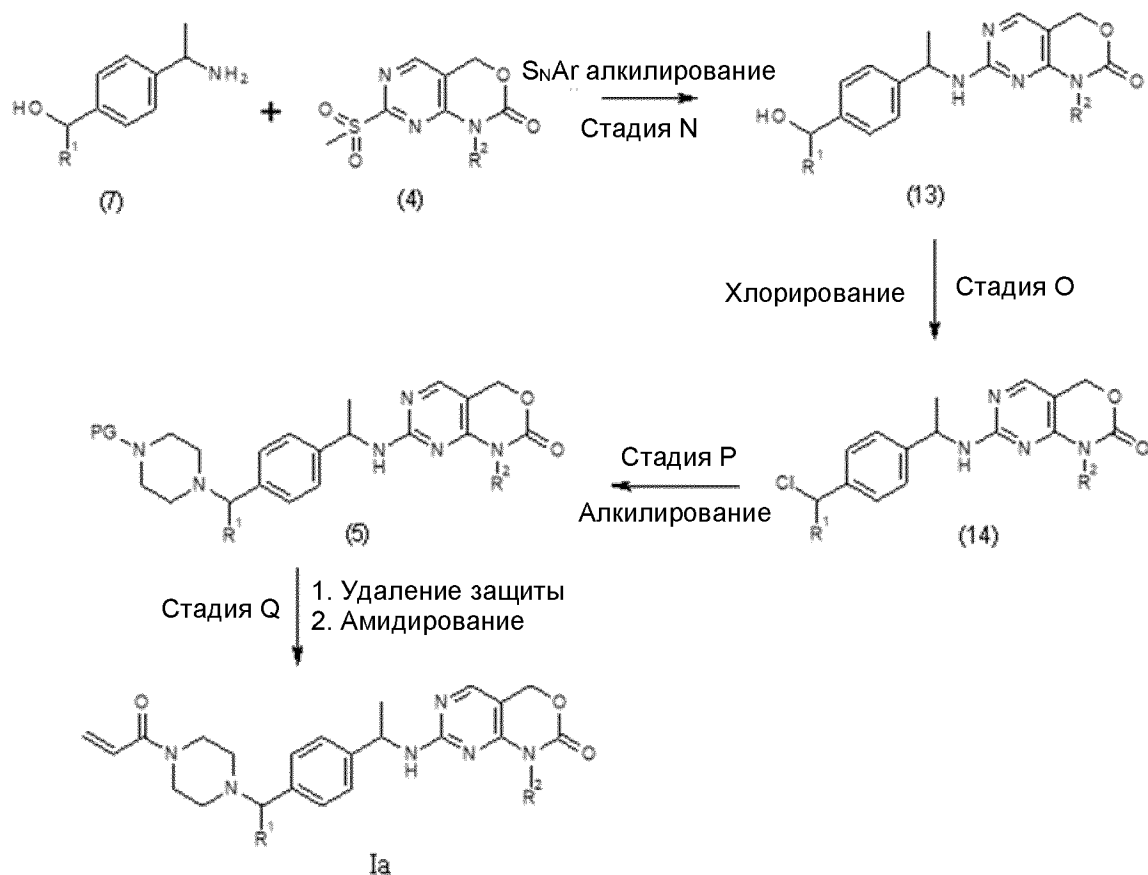
Схема 3



Согласно схеме 3 можно проводить взаимодействие соединения (11) с соединением (4), схема 1, по реакции S_NAr с использованием органического основания, такого как DIPEA, CsF для ускорения реакции, растворителя, такого как ДМСО, при температуре примерно 70-80°C с получением продукта стадии L. На стадии М, подстадия 1, можно удалять защитные группы в *трет*-бутокси-защищенном пиперазине с использованием кислоты, такой как HCl в диоксане и MeOH или ТФУК в ДХМ, в то же время, защитные группы в аллос-защищенном пиперазине можно удалять в присутствии источника палладия, такого как катализатор тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0), в растворителе, таком как ТГФ, с использованием мягкого нуклеофила, такого как димедон, с получением, пиперазина с удаленными защитными группами на подстадии 1, стадия М. На подстадии 2, стадия М, можно амидировать пиперазин с использованием акрилоилхлорида при температуре от примерно -50 до -78°C с использованием органического основания, такого как ТЭА, если амин представляет собой соль кислоты, или без него в растворителе, таком как ДХМ, с получением соединений формулы Ia. В качестве альтернативы, можно проводить амидное сочетание с использованием акриловой кислоты и соответствующего амина в растворителе, таком как ДМФ, с применением агента сочетания, такого как EDC, и добавки, такой как НОВt. Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует ряд способов и реагентов для получения амида при взаимодействии карбоновых кислот с аминами. Например, взаимодействие соответствующего амина и

акриловой кислоты в присутствии агента сочетания совместно с органическим основанием, таким как DIPEA или ТЭА, или без него может приводить к получению соединения формулы Ia. Другие агенты сочетания включают карбодиимиды, такие как DCC, DIC, или карбонилдиимидазол, такой как CDI. Для повышения выхода реакции также можно применять другие добавки для амидного сочетания, такие как HOAt. Кроме того, вместо более традиционных агентов сочетания можно применять соли урания или фосфония с ненуклеофильными анионами, такие как HBTU, HATU, PyBOP и PyBrOP. Для ускорения целевой реакции амидирования можно применять добавку, такую как DMAP.

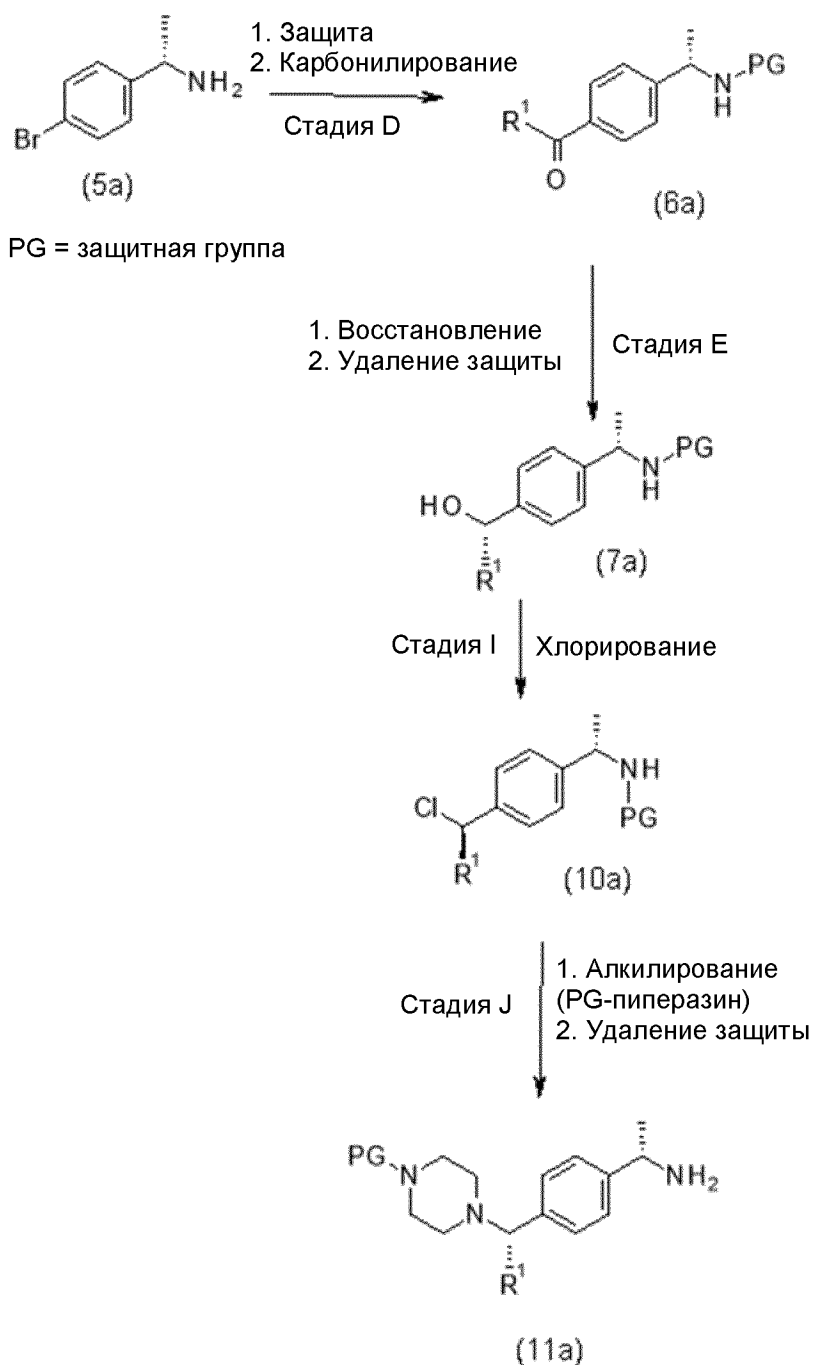
Схема 4



В качестве альтернативы, согласно схеме 4, можно проводить взаимодействие по амину в соединении с удаленными защитными группами (7), схема 2, с соединением (4), как описано на схеме 3, стадия L, по реакции S_NAr алкилирования с получением соединения 13. Гидроксил можно хлорировать, как описано на стадии I, схема 2, с получением соединения 14, стадия O. Атом хлора в соединении (14) можно заменять путем алкилирования на пиперазин, как описано на схеме 2, стадия 11, подстадия 2, с получением соединения (5). Можно удалять защитные группы в защищенном пиперазине

и затем амидировать пиперазин, как описано на схеме 3, стадия М, с получением соединений формулы Ia.

Схема 5

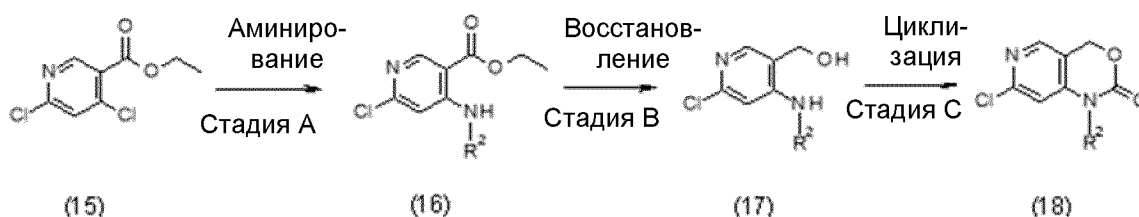


5 Согласно схеме 5 хиральный (4-(1-аминоэтил)фенил)метанол (7a) можно получать за несколько стадий из хирального арилгалогенида, такого как бромид (5a), способами, хорошо известными специалистам. Можно проводить защиту амина на подстадии 1, стадия D, где “PG” представляет собой защитную группу, предназначенную для аминогруппы, такую как амид. Арилбромид (5a) можно превращать в кетон в условиях карбонилирования с использованием лития с получением арилкетона (6a) на подстадии 2,

10

стадия D. Затем можно проводить асимметричное восстановление кетона с использованием хирального восстановителя, такого как (*R*)-RUCY-XylBINAP, в растворителе, таком как EtOH, с получением соединения 7a на подстадии 1, стадия E. Соединение (7a) можно превращать в хиральный бензилгалогенид, такой как хлорид, в стандартных условиях галогенирования с использованием галогенирующего агента, такого как бензоилхлорид, в растворителе, таком как трет-бутиловый эфир, с получением соединения (10a), стадия I. Сначала проводят взаимодействие соединения (10a) с защищенным пиперазином (PG-пиперазин) в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, в растворителе, таком как ацетонитрил, с получением защищенной формы на подстадии 1, стадия J. Затем удаляют защитные группы из защищенной формы с использованием основания, такого как водный гидроксид калия, в растворителе, таком как EtOH, с получением соединения (11a), подстадия 2, стадия J.

Схема 6



Согласно 6 последовательность взаимодействий приводит к получению 1-замещенного 7-хлор-4H-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-она (18), продукта стадии C, где R² такой, как определено выше. Например, можно проводить взаимодействие этил-4,6-дихлорпиридин-3-карбоксилата (15) с амином в стандартных условиях с получением 6-хлор-4-(амино)пиридин-3-карбоксилата (16) в растворителе, таком как ацетонитрил. Восстановление сложноэфирной группы в соединении (16) с использованием гидридного реагента, такого как алюмогидрид лития, в растворителе, таком как ТГФ, приводит к получению (4-амино-6-хлор-3-пиридил)метанола (17). Соединение, такое как 17, можно циклизовать в стандартных условиях карбамоилирования до образования оксазин-2-она с использованием трифосгена и органического основания, такого как DIPEA или ТЭА, при температуре примерно -20°C с получением соединения (18), продукта стадии C. В качестве альтернативы, для проведения карбамоилирования вместо трифосгена можно применять карбонилдигалогенид или карбонил-ди-псевдогалогенид, такой как CDI, фосген или дифосген. Можно проводить взаимодействие соединения 11, полученного, как показано выше на схемах 2 или 5 или как описано в альтернативных вариантах для каждой из схем, с соединением 18 в стандартных условиях алкилирования. Затем в полученном промежуточном соединении удаляют защитные группы и проводят

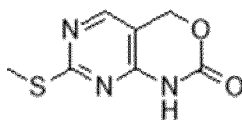
амидирование, как описано выше на схемах 3 или 4, с получением соединений формулы I, где X представляет собой СН.

На необязательной стадии можно получать фармацевтически приемлемую соль соединения формулы I или Ia путем взаимодействия соответствующего свободного основания формулы I или Ia с соответствующей фармацевтически приемлемой кислотой в подходящем растворителе в стандартных условиях. Кроме того, указанные соли можно получать одновременно с удалением азот-защитных групп. Образование таких солей хорошо известно и изучено в данной области техники. См., например, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); и Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977). Специалистам в данной области техники будет понятно, что соединение формулы I или Ia может быть легко превращено и выделено в виде фармацевтически приемлемой соли.

15

Пример получения 1

7-метилсульфанил-1,4-дигидропиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он

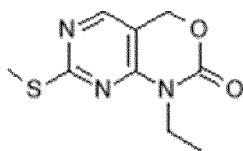


В раствор (4-амино-2-метилсульфанилпиримидин-5-ил)метанола (900 г, 5,26 моль) в ТГФ (22,5 л) добавляли трифосген (859 г, 2,9 моль) в течение 15 минут при -30°C. Добавляли DIPEA (2,449 г, 18,92 ммоль) в течение 1 часа, поддерживая при этом температуру реакционной смеси от -35 до -30°C. Затем выливали реакционную смесь в ледяную воду (30 л) и добавляли 2-метилтетрагидрофуран (10 л). Промывали органическую фазу водой и солевым раствором. Органическую фазу сушили над Na₂SO₄ и концентрировали досуха. Неочищенный продукт суспендировали в смеси петролейный эфир/EtOAc (1:1), фильтровали и концентрировали с получением желтого твердого вещества, которое использовали без дополнительной очистки (890,5 г, 1,62 моль, чистота 83%, выход 86%). МС (m/z): 198 (M+H).

25

Пример получения 2

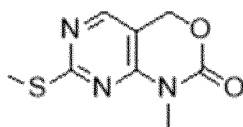
1-этил-7-(метилтио)-1,4-дигидро-2H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



В раствор 7-метилсульфанил-1,4-дигидропиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (280 г, 1,42 моль) в NMP (2,24 л) добавляли K₂CO₃ (294,2 г, 2,13 моль) и этилиодид (336,3 г, 1,99 моль) при комнатной температуре. Перемешивали смесь в течение 16 часов при 50°C, а затем разбавляли ДХМ (3 л) и водой (6 л). Отделяли органическую фазу и промывали водой и соевым раствором, и концентрировали досуха с получением неочищенного титульного соединения (286 г, 1,27 моль, чистота 83%, выход 91%). МС (m/z): 226 (M+H).

Пример получения 3

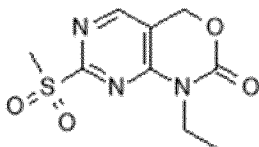
1-метил-7-метилсульфанил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



В раствор трифенилфосфина (1,61 г, 6,08 ммоль) и 7-метилсульфанил-1,4-дигидропиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (1,00 г, 5,07 ммоль) в ТГФ (25 мл) добавляли MeOH (0,248 мл, 6,08 ммоль), затем по каплям добавляли DIAD (1,21 мл, 6,08 ммоль) при температуре окружающей среды. После перемешивания в течение ночи удаляли растворитель в вакууме и очищали полученное желтое маслянистое вещество путем хроматографии на силикагеле (40-50% EtOAc/гексаны) с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (1,08 г, 5,11 ммоль, количественный выход). МС (m/z): 212 (M+H).

Пример получения 4

1-этил-7-(метилсульфонил)-1,4-дигидро-2Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



В перемешиваемый раствор 1-этил-7-(метилтио)-1,4-дигидро-2Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (286 г, 1,24 моль) в ACN (2,8 л) и воде (1,4 л) добавляли пероксимоносульфат калия (1526 г, 2,48 моль) в виде твердого вещества в течение 20

минут и перемешивали полученную смесь в течение 16 часов при 10-20°C. Фильтровали реакционную смесь и промывали полученный осадок ДХМ. Объединенные фильтраты и ДХМ промывали 5% Na₂SO₃, водой и солевым раствором. Органическую фазу сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением титульного соединения (133,8 г, чистота 93%, выход 41%). МС (m/z): 258 (M+H).

Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 4.

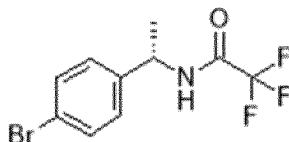
Таблица 1

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
5	1-метил-7-метилсульфонил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		244

10

Пример получения 6

N-[(1S)-1-(4-бромфенил)этил]-2,2,2-трифторацетамид

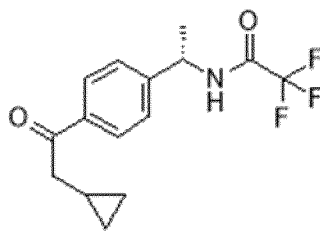


В раствор (1S)-1-(4-бромфенил)этанамин (213 г, 1,06 моль) в ACN (1,3 л) по каплям добавляли ангидрид трифторуксусной кислоты (165 мл, 1,17 моль) при 5°C, затем по каплям добавляли ТЭА (326 мл, 2,34 моль) в течение 1 часа. Через 30 минут добавляли воду (3 л) и солевой раствор (1 л), что приводило к образованию бесцветного осадка. Перемешивали взвесь в течение 15 минут, а затем отфильтровывали твердое вещество, промывали водой и гексанами и сушили в токе воздуха, затем при 40°C в вакууме с получением титульного соединения (290 г, 92%). ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 1,44 (d, 3H, *J* = 7,1 Гц), 4,98 (dddd, 1H, *J* = 7,6, 7,1, 7,1, 7,1 Гц), 7,30 (d, 2H, *J* = 8,4 Гц), 7,55 (d, 2H, *J* = 8,4 Гц), 9,91 (d, 1H, *J* = 7,6 Гц).

20

Пример получения 7

N-[(1S)-1-[4-(2-циклопропилацетил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамид



В раствор *N*-[(1*S*)-1-(4-бромфенил)этил]-2,2,2-трифторацетамида (18,00 г, 60,79 ммоль) в ТГФ (600 мл) по каплям добавляли *n*-бутиллитий (2,5 М в гексанах, 53 мл, 130 ммоль) при -78°C, поддерживая внутреннюю температуру менее -70°C. После

5 завершения добавления перемешивали смесь в течение 45 минут при -78°C, а затем добавляли 2-циклопропил-*N*-метокси-*N*-метилацетамид (11,4 г, 79,6 ммоль) в виде раствора в ТГФ (10 мл). Перемешивали смесь при -78°C в течение 45 минут, добавляли насыщенный водный хлорид аммония и нагревали смесь до комнатной температуры. Разделяли слои и сушили органический слой над безводным сульфатом натрия,

10 фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. К твердому веществу добавляли небольшое количество ДХМ ненадолго нагревали смесь для растворения твердых веществ. Концентрировали смесь до начала осаждения, а затем по каплям добавляли гексаны (150 мл) при интенсивном перемешивании с получением бесцветного твердого вещества. Собирали твердое вещество путем фильтрования, промывали

15 небольшим количеством гексанов и сушили при пониженном давлении с получением титульного соединения (13,82 г, 76%) в виде бесцветного твердого вещества. МС (*m/z*): 298,3 (*M-H*).

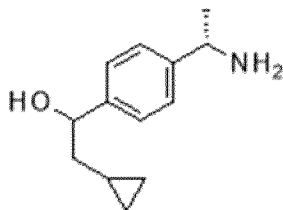
Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 7.

20 Таблица 2

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (<i>m/z</i>) (<i>M+H</i>)
8	2,2,2-трифтор- <i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-1-[4-(3-метоксипропаноил)фенил]этил]ацетамид		304

Пример получения 9

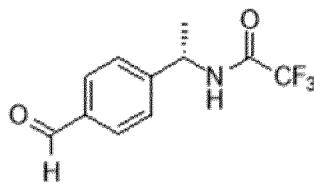
1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтанол



В раствор N-[(1S)-1-[4-(2-циклопропилацетил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамида
5 (558 мг, 1,86 ммоль) в MeOH (15 мл), охлажденный на бане с ледяной водой, добавляли
боргидрид натрия (0,1411 г, 2 экв., 3,729 ммоль). Перемешивали смесь в течение примерно
2,5 часа, а затем добавляли гидроксид калия (800 мг, 14,2 ммоль) в воде (3 мл).
Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение примерно 20 часов.
Концентрировали смесь и разделяли в ДХМ и воде. Промывали органический слой
10 насыщенным водным хлоридом натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и
концентрировали с получением титульного соединения (354 мг, 1,38 ммоль, 74%) в виде
белого твердого вещества. Использовали вещество без дополнительной очистки. ИЭР/МС
(m/z): 189,0 (M-OH).

Пример получения 10

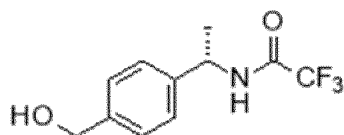
2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-(4-формилфенил)этил]ацетамид



В выдерживаемый при 0°C раствор 2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-[4-(гидроксиметил)-
фенил]этил]ацетамида (11,1 г, 44,9 ммоль) в ДХМ (450 мл) добавляли периодинан Десса-
Мартина (20,9 г, 49,3 ммоль). Перемешивали реакционную смесь в течение ночи и
20 оставляли нагреваться до комнатной температуры. Разбавляли реакционную смесь
дополнительным количеством ДХМ и промывали насыщенным водным NaHCO₃,
насыщенным водным Na₂S₂O₃ и соевым раствором. Сушили объединенные
органические слои (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали с получением остатка,
который очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом 0-50%
25 смесями EtOAc/гексаны, с получением титульного соединения в виде белого твердого
вещества (9,5 г, 39 ммоль, 86%). ИЭР/МС (m/z): 244 (M-H).

Пример получения 10а

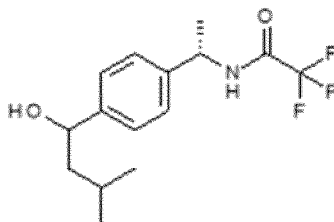
2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-[4-(гидроксиметил)фенил]этил]ацетамид



В выдерживаемый при 0°C раствор [4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]метанола (10,8 г, 71,4 ммоль) в CH₂Cl₂ (150 мл) добавляли ангидрид трифторуксусной кислоты (12 мл, 85,4 ммоль). Через 10 минут по каплям добавляли триэтиламин (24 мл, 172 ммоль) в CH₂Cl₂ (8 мл) в течение 30 минут, удаляли охлаждающую баню и перемешивали реакционную смесь в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме, разбавляли дополнительным количеством CH₂Cl₂ и промывали 1н. водной HCl и водой. Сушили органическую фазу (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали. Неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом 0-50% смесями EtOAc/гексаны, с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (11,1 г, 44,9 ммоль, 63%). ИЭР/МС (m/z): 246 (М-Н).

Пример получения 11

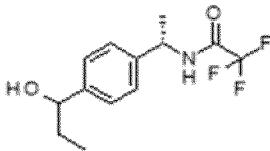
2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-[4-(1-гидрокси-3-метилбутил)фенил]этил]ацетамид



В раствор 2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-(4-формилфенил)этил]ацетамида (1,72 г, 7,01 ммоль) в ТГФ (35 мл), охлажденный на бане с ледяной водой, добавляли бромид изобутилмагния (2 М в диэтиловом эфире, 7,0 мл, 14,0 ммоль) и перемешивали в течение примерно 30 минут. Реакцию гасили насыщенным водным хлоридом аммония и разделяли смесь в EtOAc и воде. Промывали органический слой насыщенным водным хлоридом натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением титульного соединения в виде маслянистого вещества (1,40 г, 4,15 ммоль, 59%), которое использовали без дополнительной очистки. ИЭР/МС (m/z): 302,0 (М-Н).

Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 11.

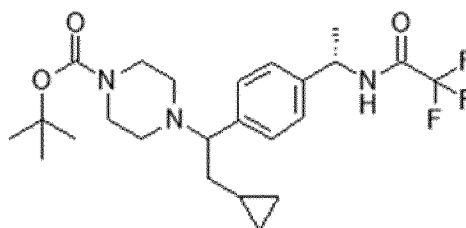
Таблица 3

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
12	2,2,2-трифтор-N-[(1S)-1-[4-(1-гидроксипропил)фенил]этил]ацетамид		293 (M+NH ₄)

5

Пример получения 13

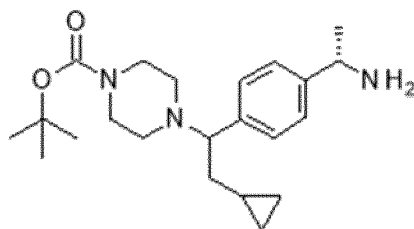
Трет-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилат



В раствор *N*-[(1S)-1-[4-(2-циклопропилацетил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамида (12,0 г, 40,1 ммоль) и *трет*-бутил-пиперазин-1-карбоксилата (17,9 г, 96,1 ммоль) в ТГФ (80 мл) добавляли изопропоксид титана (IV) (60 мл, 200 ммоль) и перемешивали смесь при 60°C в течение ночи. Охлаждали смесь до комнатной температуры и добавляли MeOH (80 мл), затем по частям добавляли цианоборгидрид натрия (5,3 г, 80 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 8 часов, а затем добавляли воду и MeOH и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Фильтровали смесь для удаления твердых веществ и промывали твердые вещества MeOH и водой. Частично концентрировали фильтрат для удаления большей части MeOH и экстрагировали остаток EtOAc (2×). Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали путем колоночной хроматографии, элюируя с градиентом от 0% до 30% смесями EtOAc в растворителе В, где растворитель В представляет собой смесь 1:1 гексаны:ДХМ, с получением титульного соединения (10,5 г, 56%) в виде бесцветного твердого вещества. МС (m/z) 470,3 [M+H].

Пример получения 14

Трет-бутил-4-[1-[4-[(1*S*)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилат

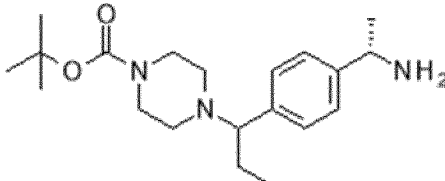


- 5 В раствор *трет*-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-трифторацетил)-амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилата (32,24 г, 68,67 ммоль) в EtOH (350 мл) добавляли водный гидроксид калия (5 М, 69 мл, 350 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 4 часов. Удаляли EtOH при пониженном давлении и добавляли к остатку насыщенный водный бикарбонат натрия и экстрагировали
- 10 смесь ДХМ. Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением титульного соединения (24,33 г, чистота 96,5%, содержание остаточного ДХМ 3,5%, выход 92%) в виде бесцветного вязкого маслянистого вещества. МС (m/z) 374,3 (M+H).

- Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в
- 15 примере получения 14.

Таблица 4

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
15	<i>трет</i> -бутил-4-[1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-аминоэтил]фенил]-3-метилбутил]пиперазин-1-карбоксилат		376
16	<i>трет</i> -бутил-4-[(1 <i>R</i>)-1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-аминоэтил]фенил]пропил]-пиперазин-1-карбоксилат, изомер 1		348

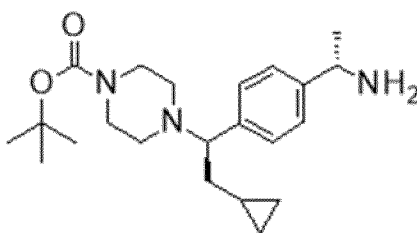
Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
17	<i>трет</i> -бутил-4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]пропил]-пиперазин-1-карбоксилат, изомер 2		348

Альтернативный пример получения 14

В раствор *трет*-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]-этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилата (2,15 г, 4,58 ммоль) в 5 EtOH (23 мл) добавляли раствор гидроксида калия (1,28 г, 22,9 ммоль) в воде (4 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре. Примерно через 6 часов концентрировали смесь. Разделяли остаток в ДХМ и насыщенном растворе бикарбоната натрия. Промывали органический слой водой и насыщенным водным хлоридом натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением титульного 10 соединения в виде маслянистого вещества, которое использовали без очистки (1,73 г, 4,49 ммоль, 98%). ИЭР/МС (m/z): 374,2 (M+H).

Пример получения 18

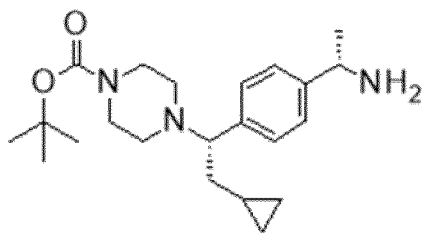
Трет-бутил-4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 1



15

Пример получения 19

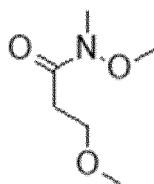
Трет-бутил-4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 2



Смесь 1:1 *трет*-бутил-4-[(1*R*)-1-[4-[(1*S*)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]-пиперазин-1-карбоксилата, диастереомер 1, и *трет*-бутил-4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилата, диастереомер 2 (3,23 г) растворяли в MeOH (40 мл) и разделяли на отдельные диастереомеры путем препаративной хиральной ВЭЖХ в следующих условиях: колонка Chiralpak AD, 20 мкм, (8 x 33 см); объем пробы 10 мл; элюент 100% MeOH с 0,2% ДМЭА; длина волны детектирования 220 нм; расход 400 мл/мин. Пример получения 12, *трет*-бутил-4-[(1*R*)-1-[4-[(1*S*)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 1, получали из элюируемого первым пика в виде прозрачного вязкого маслянистого вещества (1,50 г, 46%, д.и. >99%). МС (m/z) 374,3 (M+H). Пример получения 13, *трет*-бутил-4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-аминоэтил]-фенил]-2-циклопропилэтил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 2, получали из элюируемого вторым пика в виде прозрачного вязкого маслянистого вещества (1,46 г, 45%, д.и. >98,2%). МС (m/z) 374,3 (M+H).

Пример получения 20

N,3-диметокси-*N*-метилпропанамид

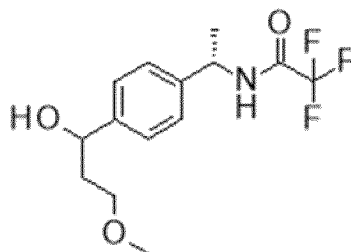


Раствор 3-метоксипропановой кислоты (62 г, 577,7 ммоль) в ДХМ (1200 мл) обрабатывали, медленно добавляя по частям 1,1'-карбонилдиимидазол (103 г, 635,2 ммоль), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Добавляли гидрохлорид *N*,*O*-диметилгидроксиламина (62 г, 635,6 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Промывали смесь водой (2×), 0,1М водн. HCl (2×) и насыщенным водным бикарбонатом натрия (2×), сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали досуха с получением неочищенного вещества. Неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом 20-40% смесями ацетона в гексанах. Полученное маслянистое вещество

сушили в течение ночи в вакууме с получением титульного соединения (69,5 г, 81,7%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2,72 (t, 2H), 3,2 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 3,7 (m, 5H).

Пример получения 21

2,2,2-трифтор-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-гидрокси-3-метоксипропил)фенил]этил]ацетамид



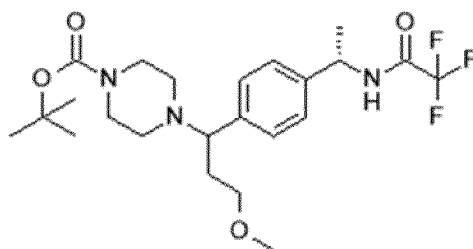
5

2,2,2-трифтор-*N*-[(1*S*)-1-[4-(3-метоксипропаноил)фенил]этил]ацетамид (23,62 г, 73,98 ммоль, 95 масс.%) растворяли в MeOH (700 мл) и обрабатывали боргидридом натрия (5,6 г, 150 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов обрабатывали смесь насыщенным водным хлоридом аммония и выпаривали MeOH. Полученное вещество помещали в воду и EtOAc, разделяли и сушили объединенные органические слои над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха. Неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя 40% EtOAc в гексанах, с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (17,82 г, 79%). МС (m/z): 306 (M+H).

15

Пример получения 22

Трет-бутил-4-[3-метокси-1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]фенил]пропил]пиперазин-1-карбоксилат

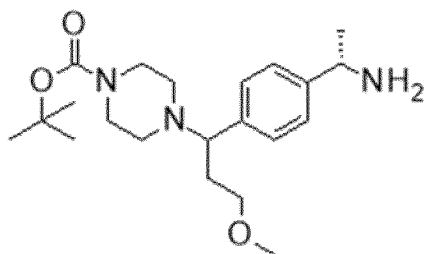


2,2,2-трифтор-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-гидрокси-3-метоксипропил)фенил]этил]ацетамид (21,76 г, 71,27 ммоль) растворяли в ДХМ (350 мл) и охлаждали до -10°C. По каплям добавляли тионилхлорид (26,12 г, 16 мл, 219,6 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 2 часов. Концентрировали смесь досуха, перерастворяли в ДХМ и повторно концентрировали. Неочищенное вещество растворяли в ACN (300 мл) и

добавляли *трет*-бутил-пиперазин-1-карбоксилат (26,55 г, 142,6 ммоль), карбонат калия (39,5 г, 286 ммоль) и йодид калия (12,0 г, 72,3 ммоль). Нагревали смесь до 80°C в течение 72 часов. Отфильтровывали полученное белое твердое вещество и промывали EtOAc. Объединенные фильтраты промывали водным хлоридом аммония, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом 40-80% смесями EtOAc в гексанах, с получением титульного соединения в виде белой пены (29,63 г, 88%). МС (m/z): 474 (M+H).

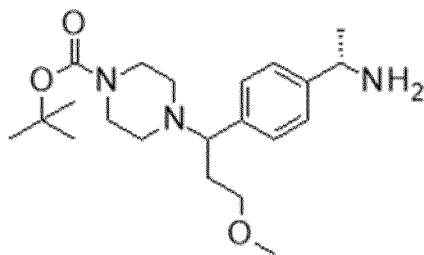
Пример получения 23

- 10 *Трет*-бутил-4-[1-[4-(1S)-1-аминоэтил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 1



Пример получения 24

- 15 *Трет*-бутил-4-[1-[4-(1S)-1-аминоэтил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 2



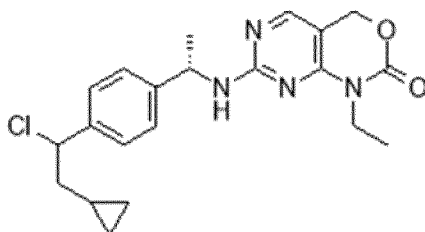
- 20 В раствор *трет*-бутил-4-[3-метокси-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]-этил]пропил]пиперазин-1-карбоксилата (29,60 г, 62,5 ммоль) в EtOH (310 мл) добавляли водн. гидроксид калия (63 мл, 5 М). Перемешивали раствор в течение 4 часов при комнатной температуре, а затем концентрировали смесь досуха. Неочищенный остаток обрабатывали водой и насыщенным водным бикарбонатом натрия и экстрагировали ДХМ (3×). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением титульного соединения (23,6 г), которое растворяли в MeOH (236 мл) и разделяли на отдельные диастереомеры путем хиральной СФХ в

следующих условиях: колонка: Lux Cellulose-1, (5 x 25 см); объем пробы: 1 мл каждые 2,5 минуты, элюент 15% MeOH/CO₂, длина волны детектирования 230 нм; расход 300 г/мин; температура колонки: 40°C; заданное давление в РОД (регулятор обратного давления): 100 бар (10 МПа); температура РОД: 40°C. Титульное соединение согласно примеру получения 28 получали из элюируемого первым пика в виде прозрачного вязкого желтого маслянистого вещества (10,1 г, 42,8%, д.и. 96,6%). МС (m/z): 378 (M+H). Титульное соединение согласно примеру получения 29 выделяли в качестве элюируемого вторым пика в виде прозрачного вязкого желтого маслянистого вещества (10,3 г, 43,6%, д.и. 95,2%). МС (m/z): 378 (M+H).

10

Пример получения 25

7-[[[(1S)-1-[4-(1-хлор-2-циклопропилэтил)фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он

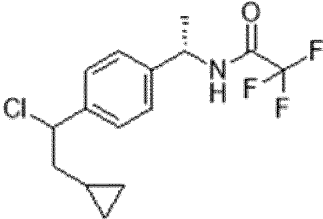
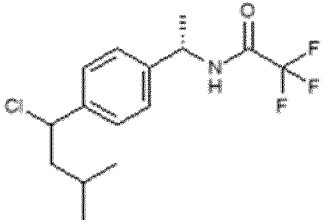
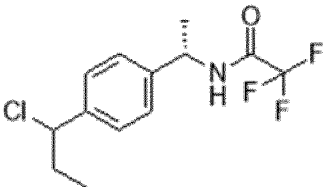


В смесь 7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-гидроксиэтил)фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (432 мг, 1,03 ммоль) и карбоната калия (741 мг, 5,37 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли тионилхлорид (0,23 мл, 3,219 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 20 минут. Фильтровали смесь через диатомитовую землю и концентрировали с получением титульного соединения (518 мг, 1,07 ммоль, 100%) в виде белой пены, которую использовали без дополнительной очистки. ИЭР/МС (m/z): 401,2/403,2 (M+H).

Следующие соединения получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 25.

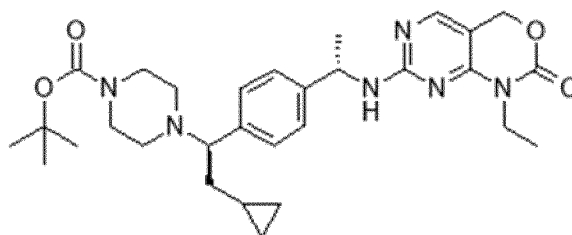
Таблица 5

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
--------------	---------------------	-----------	--------------------------

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
26	N-[(1S)-1-[4-(1-хлор-2-циклопропилэтил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамид		318
27	N-[(1S)-1-[4-(1-хлор-3-метилбутил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамид		320
28	N-[(1S)-1-[4-(1-хлорпропил)фенил]этил]-2,2,2-трифторацетамид		311 (M+NH ₄)

Пример получения 29

Трет-бутил-4-[(1R)-2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилат



5

В раствор *трет*-бутил-4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]-пиперазин-1-карбоксилата (864 мг, 3,35 ммоль) и 1-этил-7-(метилсульфонил)-1,4-дигидро-2Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (1,14 г, 3,05 ммоль) в ДМСО (15 мл) добавляли CsF (1,39 г, 9,15 ммоль) и DIPEA (0,80 мл, 4,6 ммоль). Перемешивали смесь при 60°C в течение 1,5 часа. Охлаждали смесь до комнатной температуры, разбавляли EtOAc и промывали водой (2×). Объединенные водные слои после промывки экстрагировали EtOAc и сушили объединенные органические экстракты (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали досуха. Полученный неочищенный продукт очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом от 55% до 95% смесями EtOAc в

10

гексанах, с получением титульного соединения в виде бесцветного твердого вещества (1,47 г, 88%). МС (m/z) 551,3 (M+H).

Следующие соединения получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 29.

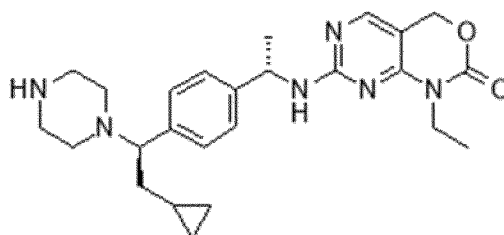
5 Таблица 6

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
30	<i>Трет</i> -бутил-4-[(1S)-2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]-пиперазин-1-карбоксилат		551
31	<i>Трет</i> -бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат (диастереомер 1)		555
32	<i>Трет</i> -бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат (диастереомер 2)		555
33	<i>Трет</i> -бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-метил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]-пиперазин-1-карбоксилат (диастереомер 1)		537
34	<i>Трет</i> -бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-метил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]-пиперазин-1-карбоксилат (диастереомер 2)		537
35	<i>Трет</i> -бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат		553

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
	метилбутил]пиперазин-1-карбоксилат		
36	<i>Трет</i> -бутил-4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]-фенил]пропил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 1		525
37	<i>Трет</i> -бутил-4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-пропил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 2		525
38	7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-гидроксиэтил)фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		383

Пример получения 39

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



5

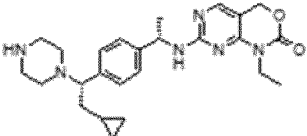
В раствор трет-бутил-4-[(1R)-2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилата (29,45 г, 53,48 ммоль) в EtOAc (570 мл) по каплям добавляли хлороводородную кислоту (95 мл, 5,5 М в изопропанол, 520 ммоль) при 40°C. Оставляли смесь перемешиваться на 3 часа при комнатной температуре, а затем добавляли воду (300 мл). Разделяли слои и экстрагировали органический слой водой (2 × 150 мл). Доводили pH объединенных водных экстрактов до 10 путем добавления 5н. NaOH, в результате чего образовывалось бесцветное твердое вещество. Собирали твердое вещество путем фильтрования,

10

промывали водой и сушили на воздухе с получением титульного соединения (25,18 г, 99%) в виде бесцветного твердого вещества. МС (m/z) 451,2 (M+H).

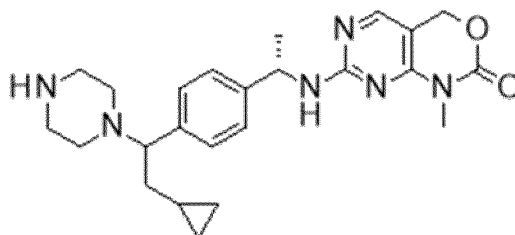
Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 39.

5 Таблица 7

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
40	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		451

Пример получения 41

7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил)фенил]этил]амино]-1-метил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 1



10

Трет-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-метил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 1 (245 мг, 0,46 ммоль) растворяли в ДХМ (2,5 мл). Добавляли ТФУК (0,7 мл, 9 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 90 минут.

15 Реакцию гасили 20% водн. K₂CO₃ и экстрагировали смесь ДХМ (3×). Объединенные органические экстракты сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха в глубоком вакууме в течение ночи с получением титульного соединения в виде белой пены (196 мг, 88,5%). МС (m/z) 437 (M+H).

20 Следующие соединения получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 41.

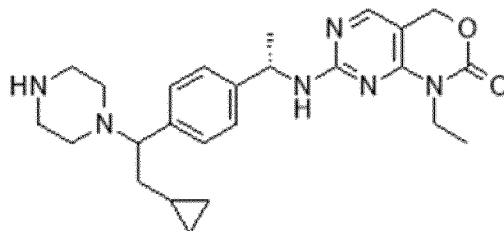
Таблица 8

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
42	7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил)фенил]этил]-амино]-1-метил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 2		437
43	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-(3-метил-1-пиперазин-1-илбутил)фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		453
44	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-(3-метил-1-пиперазин-1-илбутил)фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		453
45	7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил)фенил]этил]амино]-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		436
46	7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил)фенил]этил]амино]-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		436
47	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-пиперазин-1-илпропил]фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		425

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
48	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-пиперазин-1-илпропил]-фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		425

Пример получения 49

7-[[[(1S)-1-[4-(2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил)фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



5

Смесь 7-[[[(1S)-1-[4-(1-хлор-2-циклопропилэтил)фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (518 мг, 1,07 ммоль), карбоната калия (445 мг, 3,217 ммоль), йодида натрия (161 мг, 1,07 ммоль) и пиперазина (277 мг, 3,22 ммоль) в ACN (3 мл) нагревали в герметичной пробирке до 70°C. Через ~8 часов охлаждали смесь до комнатной температуры, разбавляли EtOAc, фильтровали через диатомитовую землю и концентрировали. Неочищенное вещество очищали на силикагеле, элюируя с градиентом от 1% до 7% смесями 3 М NH₃/MeOH в ДХМ, с получением титульного соединения (306 мг, 0,66 ммоль, 62%) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 451,2 (M+H).

10

Следующие соединения получали по существу при помощи способа, описанного в примере получения 49, с использованием соответствующего защищенного пиперазина.

15

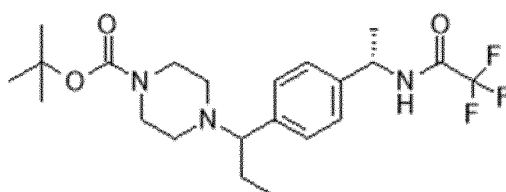
Таблица 9

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
--------------	---------------------	-----------	--------------------------

Пр.пол. №	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
50	<i>Трет</i> -бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]-этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилат		470
51	<i>Трет</i> -бутил-4-[3-метил-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]-этил]фенил]бутил]-пиперазин-1-карбоксилат		472
52	<i>Трет</i> -бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]-этил]фенил]пропил]-пиперазин-1-карбоксилат		444

Пример получения 53

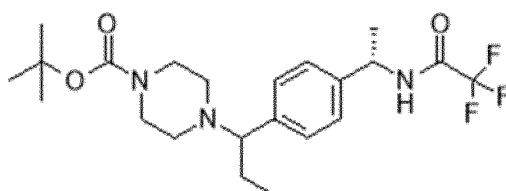
Трет-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]фенил]пропил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 1



5

Пример получения 54

Трет-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]фенил]пропил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 2

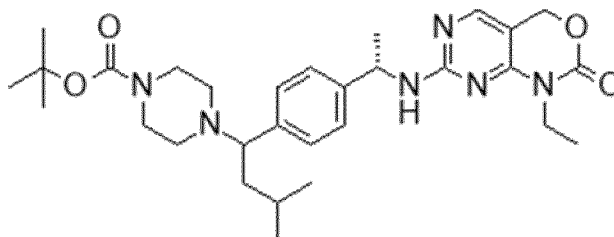


10 *Трет*-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]фенил]пропил]-пиперазин-1-карбоксилат (29,2 г, 65,8 ммоль) растворяли в MeOH (584 мл) и разделяли путем хиральной СФХ в следующих условиях: колонка: Chiralpak AD-H, 5x25 см; элюент 85/15 CO₂/MeOH с 0,5% диметилэтиламина; расход 300 г/мин; длина волны детектирования 230 нм; температура колонки 40°C; заданное давление в РОД 100 бар (10

МПа); температура растворителя 40°C. Изомер 1 выделяли в качестве элюируемого первым пика (14,15 г, 31,9 ммоль). ИЭР/МС (m/z): 444 (М+Н). Изомер 2 выделяли в качестве элюируемого вторым пика (13,87 г, 31,3 ммоль). ИЭР/МС (m/z): 444 (М+Н).

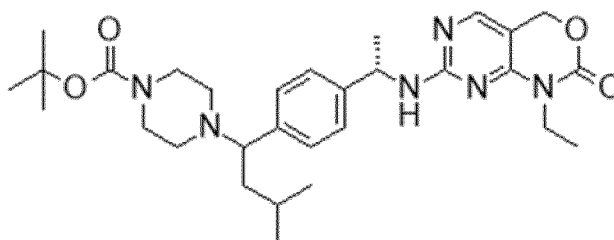
Пример получения 55

- 5 *Трет*-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метилбутил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 1



Пример получения 56

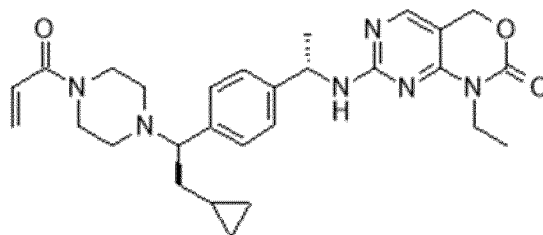
- 10 *Трет*-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метилбутил]пиперазин-1-карбоксилат, изомер 2



- 15 *Трет*-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-этил-2-оксо-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метилбутил]пиперазин-1-карбоксилат (2,6 г, 4,70 ммоль) растворяли в смеси 4:1 изопропанол:хлороформ (50 мл) и разделяли путем хиральной СФХ в следующих условиях: колонка: Chiralpak AD-H, 5x25 см; объем пробы 1 мл; элюент 75/25 CO₂/IPA с 0,5% диметилэтиламина; расход 280 г/мин; длина волны детектирования 240 нм; температура колонки 40°C; заданное давление РОД 100 бар (10 МПа); температура растворителя 40°C. Соединение согласно примеру получения 45 выделяли в качестве элюируемого первым пика (1,02 г, 1,89 ммоль). ИЭР/МС (m/z): 553,4 (М+Н). Соединение согласно примеру получения 46 выделяли в качестве элюируемого вторым пика (1,05 г, 1,90 ммоль). ИЭР/МС (m/z): 553,4 (М+Н).
- 20

Пример 1

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он



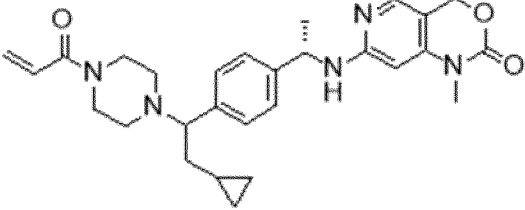
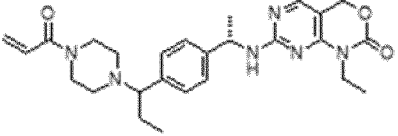
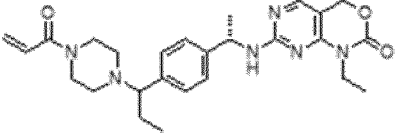
- 5 В раствор 7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-пиперазин-1-илэтил]фенил]этил]-амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (1,73 г, 3,26 ммоль) в ДХМ по каплям добавляли акрилоилхлорид (305 мкл, 3,75 ммоль, в 2 мл ДХМ) при -78°C. После выдерживания в течение 2 минут при -78°C добавляли несколько капель MeOH, затем насыщенный водный бикарбонат натрия и оставляли смесь нагреваться до комнатной
- 10 температуры. Добавляли ДХМ, разделяли слои и экстрагировали водный слой ДХМ. Сушили объединенные органические экстракты (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали досуха. Полученный неочищенный продукт очищали путем хроматографии на силикагеле (от 25% до 40% растворителя А в растворителе В, где растворитель А представляет собой 10% MeOH/ацетон, а растворитель В представляет
- 15 собой гексаны) с получением титульного соединения в виде бесцветного твердого вещества (1,16 г, 70%). МС (m/z) 505,3 (M+H).

Следующие соединения получали по существу при помощи способа, описанного в примере 1.

Таблица 11

№ пр.	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
2	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		505

№ пр.	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
3	7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-метил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 1		491
4	7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]-этил]амино]-1-метил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 2		491
5	7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]-этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		505
6	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[3-метил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)бутил]фенил]-этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он		507
7	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[3-метил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)бутил]фенил]-этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		507
8	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[3-метил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)бутил]фенил]-этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		507
9	7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]-этил]амино]-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		490

№ пр.	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (m/z) (M+H)
10	7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]-этил]амино]-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		490
11	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]-этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1		479
12	1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]-этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2		479

Рентгеновское определение кристаллической структуры комплекса IDH1 с 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-оном.

- 5 Кристаллическую структуру комплекса IDH1 с 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-оном определяли по данным рентгеновской дифракции, полученным на APS 31-ID с каналом синхротронного излучения в Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439. Белок IDH1 с мутацией R132H коммерчески
- 10 доступен из нескольких источников. В качестве альтернативы, белок IDH1 R132H можно выделять из коммерчески доступной клеточной линии, имеющей мутацию, способами, хорошо известными и традиционно используемыми специалистами в данной области техники. Кристаллы получали в кюветах с сидячими каплями, уравновешенных при 21°C, с использованием белка IDH1 с мутацией R132H в концентрации 15 мг/мл в буфере,
- 15 содержащем 10 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM хлорид натрия, 10% глицерина, 5 mM дитиотреитол и 2 mM 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, и смешивали с равным объемом резервуарного раствора, содержащего 100 mM Bis Tris, pH 5, 5% ДМСО, 22% ПЭГ 3350 и 200 mM сульфат аммония. Кристаллы вымачивали в течение ночи в
- 20 растворе, содержащем 3 mM 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-

еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, после чего переносили в раствор, дополненный 22% этиленгликолем, и быстро замораживали для сбора данных. Дифракционные данные с разрешением 2,8 Å собирали при использовании рентгеновского излучения с длиной волны 0,9793 Å. Кристаллы принадлежат к пространственной группе P4₃2₁2 и имеют параметры ячейки a=82,74 Å, b=82,74 Å, c=299,4 Å, α=β=γ=90°. Структура, которую определяли методом молекулярного замещения, содержала одну димерную молекулу IDH1. Карты распределения электронной плотности, вычисленные после моделирования белка IDH1, имели значения плотности явно указывающие на связывание двух молекул 7-[[1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она.

Сtereoхимию 7-[[1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она определяли по данным электронной плотности, строили модели обеих молекул 7-[[1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она и уточняли структуру комплекса с использованием R-факторов Rwork=0,192 и Rfree=0,228.

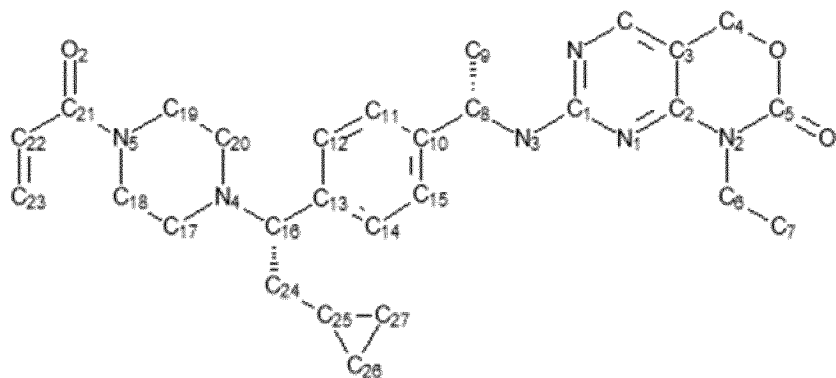


Таблица 12

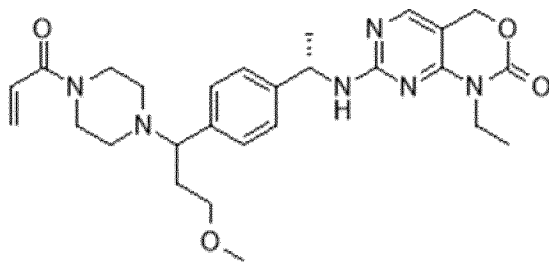
Координаты для 7-[[1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она.

АТОМ	X	Y	Z
O2	48,364	1,353	-2,648
C21	49,136	0,711	-1,964
C22	48,932	-0,779	-1,799
C23	47,694	-1,239	-2,530

АТОМ	X	Y	Z
N5	50,174	1,294	-1,330
C18	50,422	2,738	-1,428
C17	51,848	3,008	-1,849
C19	51,126	0,603	-0,449
C20	52,568	0,906	-0,834
N4	52,797	2,388	-0,868
C16	54,242	2,810	-1,061
C24	55,094	2,321	0,113
C25	56,411	3,091	0,050
C27	57,062	3,523	1,306
C26	56,432	4,534	0,413
C13	54,761	2,408	-2,428
C12	55,212	1,125	-2,730
C11	55,701	0,819	-3,988
C14	54,812	3,365	-3,432
C15	55,295	3,057	-4,691
C10	55,742	1,778	-4,997
C8	56,243	1,464	-6,405
C9	55,107	1,279	-7,400
N3	57,128	0,291	-6,469
C1	58,372	0,310	-5,968
N	59,104	-0,809	-6,086
N1	58,775	1,474	-5,441
C2	60,041	1,523	-5,009
N2	60,425	2,651	-4,254
C6	59,506	3,796	-4,105
C7	58,569	3,631	-2,901
C5	61,546	2,595	-3,438
O1	61,736	3,358	-2,523
O	62,437	1,605	-3,629
C4	62,347	0,684	-4,739
C3	60,923	0,429	-5,132
C	60,369	-0,717	-5,655

Пример 13

1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[3-метокси-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 1



Трет-бутил-4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-[(1-этил-2-оксо-4*H*-пиримидо[4,5-*d*][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]-3-метоксипропил]пиперазин-1-карбоксилат (1,372 г, 2,473 ммоль) растворяли в ДХМ (15 мл) и добавляли ТФУК (10 мл, 15,08 г, 132,3 ммоль).

- 5 Перемешивали реакционную смесь в течение 1 часа, а затем концентрировали досуха. Неочищенное вещество растворяли в ДХМ (12 мл) и DIPEA (1,25 мл, 7,17 ммоль) и охлаждали смесь до -78 градусов. По каплям добавляли акрилоилхлорид (0,18 мл, 0,20 г, 2,2 ммоль). Через 10 минут добавляли несколько капель метанола для гашения оставшегося акрилоилхлорида и концентрировали реакционную смесь досуха (на холоду).
- 10 Неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле, элюируя с градиентом 50-70% смесями ацетона в гексанах, с получением титульного соединения в виде белой пены (867 мг, 73%). МС (*m/z*): 509 (*M*+*H*).

Следующее соединение получали по существу при помощи способа, описанного в примере 13.

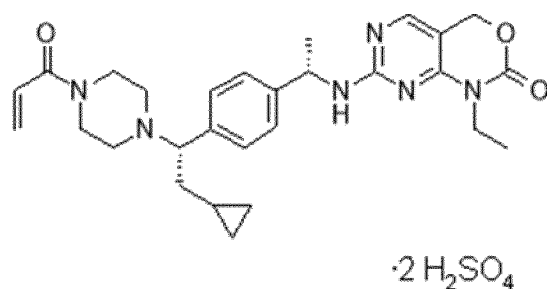
15

Таблица 13

№ пр.	Химическое название	Структура	ИЭР/МС (<i>m/z</i>) (<i>M</i> + <i>H</i>)
14	1-этил-7-[[[(1 <i>S</i>)-1-[4-[3-метокси-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]-фенил]этил]амино]-4 <i>H</i> -пиримидо[4,5- <i>d</i>][1,3]оксазин-2-он, диастереомер 2		509

Пример 15

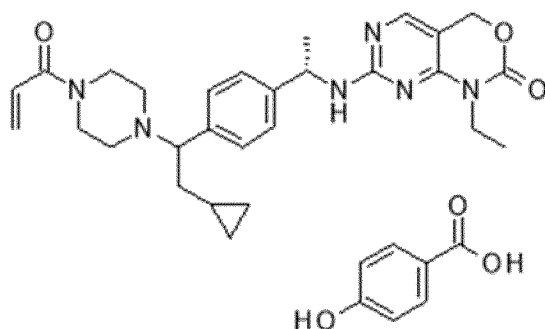
Дисульфат 7-[[[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4*H*-пиримидо[4,5-*d*][1,3]оксазин-2-она



7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]-этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он (188 мг) помещали в 5 мл ацетона при перемешивании при 1000 об./мин/60°C. Навеска превращалась в прозрачный раствор. По каплям добавляли 45 мкл серной кислоты (разбавленной в 2 мл ацетона). После добавления нескольких капель образовывалась густая белая взвесь. После добавления половины серной кислоты плотность взвеси изменялась. Вторую половину серной кислоты добавляли медленно по каплям. Взвесь становилась слегка клейкой, после чего превращалась в ярко-белую свободно текучую взвесь твердого вещества. Через 30 минут выключали подогрев плитки и охлаждали навеску до комнатной температуры с получением густой взвеси белого твердого вещества. Белое твердое вещество выделяли путем вакуумного фильтрования. Полученный осадок представлял собой ярко-белое твердое вещество. Образец сушили на месте на фильтре в токе воздуха в течение 20 минут, затем при 70°C в вакуумной печи в течение ночи. Выделяли 266 мг (выход 96,9%).

Пример 16

Соль 7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]-амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она и 4-гидроксibenзойной кислоты



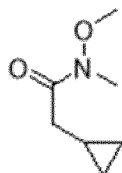
В раствор 7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (84 мг, 0,165 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли 4-гидроксibenзойную кислоту (0,023 г, 0,165 ммоль). После перемешивания в течение 5 минут медленно выпаривали растворитель в токе азота. Полученное твердое вещество дополнительно сушили в вакууме с получением 4-

гидроксibenзоата 7-[[[(1S)-1-[4-[2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]-фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-она (105 мг, 0,1617 ммоль) в виде белого твердого вещества. МС (m/z): 423,2 (M+H).

Пример получения 57

5

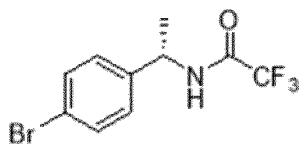
2-циклопропил-N-метокси-N-метилацетамид



В перемешиваемую 500 мл круглодонную колбу помещали дихлорметан (160 мл, 8 объемов) и 1,1'-карбонилдиимидазол (35,63 г, 1,1 экв.). Охлаждали гетерогенную смесь до 15°C и в смесь помещали раствор 2-циклопропилуксусной кислоты (20,0 г, 1,0 экв.) в дихлорметане (40 мл, 2 объема) со скоростью, позволяющей поддерживать внутреннюю температуру ниже 20°C. Нагревали полученный раствор до 25°C и перемешивали в течение 2 часов. Затем охлаждали раствор до 15°C и по частям вводили гидрохлорид N,O-диметилгидроксиламина (21,43 г, 1,1 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 20°C. Нагревали полученную гетерогенную смесь до 25°C и перемешивали в течение 15 часов. Затем разбавляли реакционную смесь водой (160 мл, 8 объемов) и перемешивали в течение 15 минут. Останавливали перемешивание и отделяли нижний водный слой. Полученный водный слой еще дважды экстрагировали дихлорметаном (100 мл, 5 объемов x 2) и объединяли органические слои. Объединенные органические слои дважды промывали 1,5н. HCl (100 мл, 5 объемов x 2). Затем органический слой дважды промывали 10% водным бикарбонатом натрия (100 мл, 5 объемов x 2). Затем органический слой промывали водой (100 мл, 5 объемов), после чего насыщенным водным хлоридом натрия (100 мл, 5 объемов). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия (1,0% (масс./масс.)). Фильтровали массу и промывали дихлорметаном (20 мл, 1 объем), а затем концентрировали в вакууме. Полученное твердое вещество сушили в глубоком вакууме в течение 5 часов с получением титульного соединения (25,9 г, выход 90,5%). ИЭР/МС (m/z) 144,1 (M+H).

Альтернативный пример получения 6

(S)-N-(1-(4-бромфенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид

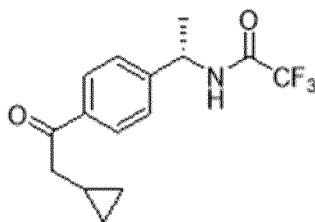


В перемешиваемую 250 мл круглодонную колбу помещали дихлорметан (100 мл, 10 объемов), затем (*S*)-(-)-1-(4-бромфенил)этиламин (10,0 г, 1,0 экв.). Охлаждали раствор до 0°C и в охлажденный раствор медленно вводили ангидрид трифторуксусной кислоты (13,12 г, 1,25 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Перемешивали полученную гетерогенную смесь при 0°C в течение 2 часов, в течение которых медленно добавляли триметиламин (12,64 г, 2,5 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Перемешивали смесь еще час, а затем гасили реакцию путем добавления воды (30 мл, 3 объема). Нагревали двухфазную смесь до 25°C и перемешивали в течение 30 минут. Затем разделяли слои и водный слой дополнительно дважды экстрагировали дихлорметаном (50 мл, 5 объемов x 2). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным хлоридом натрия (50 мл, 5 объемов) и сушили над безводным сульфатом натрия (1 масс.%). Фильтровали высушенный раствор и промывали дихлорметаном (10 мл, 1 объем) и концентрировали раствор в вакууме с получением неочищенного белого твердого вещества. Неочищенное твердое вещество суспендировали в петролейном эфире (100 мл, 10 объемов) в течение 2 часов при 25°C и собирали твердое вещество путем фильтрования. Влажное твердое вещество сушили в вакууме при 40°C в течение 8 часов с получением титульного соединения (13,3 г, выход 90%). ИЭР/МС (*m/z*) 295,3 (*M*+*H*).

20

Пример получения 58

(*S*)-*N*-(1-(4-(2-циклопропилацетил)фенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид

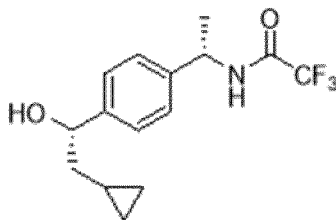


В 10 л реакционный сосуд с верхнеприводной мешалкой помещали метил-*трет*-бутиловый эфир (1500 мл, 15 объемов). В перемешиваемый раствор вводили (*S*)-*N*-(1-(4-бромфенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид (100 г, 1,0 экв.). Перемешивали гетерогенную смесь при 25°C в течение 30 минут, а затем добавляли тетрагидрофуран (500 мл, 5 объемов). Охлаждали полученный гомогенный раствор до -83°C. В раствор медленно добавляли *n*-бутиллитий (297 мл, 2,2 экв.), поддерживая температуру ниже -78°C, и

перемешивали полученный раствор при -83°C в течение 1,5 часа. В охлажденный раствор добавляли раствор 2-циклопропил-N-метокси-N-метилацетамида (53,19 г, 1,1 экв.) в метил-*трет*-бутиловом эфире (200 мл, 2 объема), поддерживая внутреннюю температуру ниже -78°C . Перемешивали полученный раствор при -83°C в течение 1,5 часа, после чего
5 нагревали раствор до -30°C и гасили реакцию путем добавления насыщенного водного хлорида аммония (5 л, 5 объемов). Нагревали гашеную реакционную смесь до 25°C и разделяли слои. Экстрагировали водный слой метил-*трет*-бутиловым эфиром (500 мл, 5 объемов). Объединенные органические слои промывали водой (500 мл, 5 объемов), затем насыщенным водным хлоридом натрия (500 мл, 5 объемов), а затем сушили над
10 безводным сульфатом натрия (50 г, 0,5% (масс./масс.)). Фильтровали массу и промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром (50 мл, 0,5 объема). Концентрировали полученный раствор в вакууме, оставляя примерно 1 объем раствора. В смесь после концентрирования вводили петролейный эфир (1500 мл, 15 объемов) и перемешивали полученную взвесь при температуре ниже 30°C в течение 2 часов. Собирали твердое вещество путем
15 фильтрования и сушили в вакууме при 40°C в течение 8 часов с получением титульного соединения (65,9 г, выход 67%). ИЭР/МС m/z 298,0 (M-H).

Пример получения 59

N-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-циклопропил-1-гидроксиэтил)фенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид

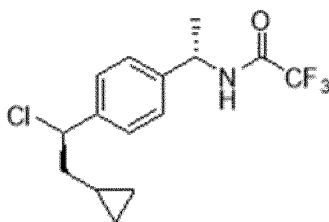


20 В реактор для гидрирования помещали абсолютный этанол (7,89 кг, 10 объемов). В перемешиваемый раствор добавляли (*S*)-*N*-(1-(4-(2-циклопропилацетил)фенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид (1,0 кг, 1,0 экв.). В раствор вводили раствор *трет*-бутоксиды калия (1,0 М в *i*BuOH, 0,41 кг, 0,5 объема), поддерживая внутреннюю температуру ниже 30°C . Затем в раствор добавляли (*R*)-RUCY®-XylBINAP (0,0675 кг, 0,017 экв.). Гидрогенизатор
25 дважды продували газообразным водородом, перемешивая при 25°C . После продувки перемешивали раствор под давлением 4,5 кг водорода при 25°C в течение 5 часов. Через 5 часов сбрасывали давление в растворе, а затем концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 42°C . Маслянистое вещество растворяли в метил-*трет*-бутиловом эфире (11,115 кг, 15 объемов), а затем
30 концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже

45°C. Маслянистое вещество растворяли в метил-*трет*-бутиловом эфире (11,115 кг, 15 объемов), а затем концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. В маслянистое вещество вводили метил-*трет*-бутиловый эфир (22,23 кг, 30 объемов) при 25°C. Полученный раствор промывали водой (15,0 кг, 15 объемов), затем раствором NaCl в воде (5,4 кг NaCl в 15,0 л воды). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия (1,5 кг, 1,5 (масс./масс.)), а затем фильтровали и промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром (1,112 кг, 1,5 объема). В отфильтрованный раствор помещали активированный уголь (0,3 кг, 0,3 (масс./масс.)) и смесь перемешивали и грели при 40°C в течение 2 часов. Затем фильтровали смесь и промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром (1,112 кг, 1,5 объема). Отфильтрованный раствор концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. Маслянистое вещество растворяли в петролейном эфире (9,84 кг, 15 объемов) и концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. Маслянистое вещество растворяли в петролейном эфире (9,84 кг, 15 объемов) и концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. В маслянистое вещество вводили петролейный эфир (19,68 кг, 30 объемов) и перемешивали смесь при 30°C в течение 3 часов и собирали полученное твердое вещество путем фильтрования и промывали петролейным эфиром (9,84 кг, 15 объемов). Выделенное твердое вещество сушили в вакууме при 40°C в течение 5 часов с получением титульного соединения (0,79 кг, 79%). ИЭР/МС m/z 300,0 (M-H).

Пример получения 60

N-((*S*)-1-(4-((*R*)-1-хлор-2-циклопропилэтил)фенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид

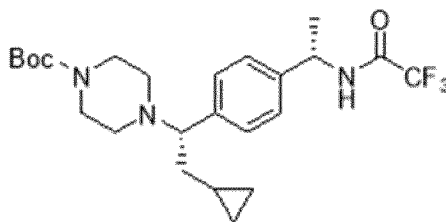


В реактор помещали метил-*трет*-бутиловый эфир (4,45 кг, 6 объемов) и *N*-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-циклопропил-1-гидроксиэтил)фенил)этил)-2,2,2-трифторацетамид (1,0 кг, 1,0 экв.). Охлаждали раствор до 10°C и медленно добавляли 1-формилпирролидин (0,066 кг, 0,2 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 13°C. Затем в раствор медленно добавляли бензоилхлорид (0,56 кг, 1,2 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 13°C. Нагревали полученный раствор до 25°C и перемешивали в течение периода до 36 часов (прохождение взаимодействия можно отслеживать во время реакции, и если она

прекращается, то можно вводить дополнительные количества 1-формилпирролидина и бензоилхлорида). После завершения взаимодействия концентрировали реакционную смесь с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 40°C. Охлаждали маслянистое вещество до 15°C, а затем гасили реакцию водным 10% раствором бикарбоната натрия (22,0 кг, 20 объемов) и перемешивали в течение 3 часов при 25°C. В двухфазную смесь вводили петролейный эфир (6,56 кг, 10 объемов). Отделяли органический слой. Экстрагировали водный слой петролейным эфиром (6,56 кг, 10 объемов). Объединенные органические слои трижды промывали водным 10% бикарбонатом натрия (5,0 л, 5 объемов). Затем промывали органический слой водой (5,0 л, 5 объемов), а после этого - соевым раствором (5,0 л, 5 объемов). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия (0,5 кг, 0,5 (масс./масс.)). Затем фильтровали смесь и промывали петролейным эфиром (0,33 кг, 0,5 объема). Концентрировали фильтрат с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 40°C. Маслянистое вещество растворяли в ацетонитриле (3,93 кг, 5 объемов) и концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 40°C. Маслянистое вещество растворяли в ацетонитриле (3,93 кг, 5 объемов) и концентрировали с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 40°C. Маслянистое вещество растворяли в ацетонитриле (7,86 кг, 10 объемов) и использовали полученный неочищенный раствор титульного соединения на следующей стадии. ИЭР/МС m/z 318,0 (М-Н).

Пример получения 61

Трет-бутил-4-((S)-2-циклопропил-1-(4-((S)-1-(2,2,2-трифторацетида)этил)фенил)этил)пиперазин-1-карбоксилат



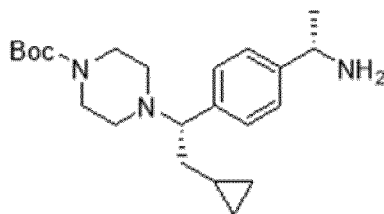
В полученный выше раствор N-((S)-1-(4-((R)-1-хлор-2-циклопропилэтил)фенил)-этил)-2,2,2-трифторацетида добавляли N-Вос-пиперазин (0,924 кг, 1,5 экв.), затем бикарбонат натрия (1,1 кг, 4,0 экв.). Нагревали полученную смесь до 85°C в течение 60 часов. Примечание: пробы из реакционной смеси отбирали каждые 24 часа, и после отбора каждой пробы в реакционную смесь вводили дополнительное количество N-Вос-пиперазина (0,31 кг, 0,5 экв.). После завершения взаимодействия концентрировали

реакционную смесь в вакууме при температуре ниже 45°C с получением маслянистого вещества. Маслянистое вещество разбавляли водой (10,0 кг, 10 объемов) и метил-*трет*-бутиловым эфиром (7,41 кг, 10 объемов). Разделяли полученную двухфазную смесь и экстрагировали водный слой метил-*трет*-бутиловым эфиром (7,41 кг, 10 объемов).

- 5 Объединенные органические слои пять раз экстрагировали 30% лимонной кислотой (5,0 л, 5 объемов). Объединенные водные слои дважды промывали петролейным эфиром (6,56 кг, 10 объемов). Доводили pH водного слоя до 9 путем добавления карбоната натрия (примерно 25,0 кг, 25 (масс./масс.)) при 15°C. Щелочной водный слой экстрагировали метил-*трет*-бутиловым эфиром (7,41 кг, 10 объемов). Объединенные органические слои
- 10 промывали водой (5,0 л, 5 объемов) и соевым раствором (5,0 л, 5 объемов). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия (0,5 кг, 50% (масс./масс.)). Фильтровали смесь и промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром (0,37 кг, 0,5 объема). Концентрировали фильтрат с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 40°C. Полученное маслянистое вещество растворяли в абсолютном
- 15 этаноле (3,95 кг, 5 объемов) и неочищенный раствор титульного соединения использовали непосредственно на следующей стадии. ИЭР/МС m/z 374,3 ($M+H-CF_3CO$).

Пример получения 62

Трет-бутил-4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-аминоэтил)фенил)-2-циклопропилэтил)пиперазин-1-карбоксилат



- 20 В полученный выше раствор *трет*-бутил-4-((*S*)-2-циклопропил-1-(4-((*S*)-1-(2,2,2-трифторацетидамо)этил)фенил)этилпиперазин-1-карбоксилата добавляли абсолютный этанол (3,7 кг, 3,7 (масс./масс.)). Охлаждали раствор до 20°C и добавляли 1 М водный гидроксид калия (0,168 кг КОН в 3,0 кг воды). Перемешивали полученную смесь при 25°C
- 25 в течение 10 часов, а затем гасили реакцию путем медленного добавления 30% водной лимонной кислоты (5,0 кг, 5 (масс./масс.)), поддерживая внутреннюю температуру ниже 30°C. В погашенный раствор вводили метил-*трет*-бутиловый эфир (7,41 кг, 7,41 (масс./масс.)). Разделяли слои и экстрагировали органический слой 30% водной лимонной кислотой (5,0 кг, 5 (масс./масс.)). Доводили pH водного слоя до 8 путем
- 30 добавления карбоната натрия (примерно 25,0 кг, 25 (масс./масс.)) при 15°C. Щелочной

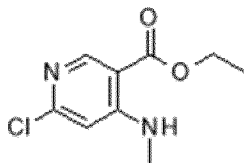
водный слой дважды экстрагировали этилацетатом (7,41 кг, 7,41 (масс./масс.)). Объединенные органические слои промывали водой (5,0 кг, 5 (масс./масс.)), а затем соевым раствором (5,0 кг, 5 (масс./масс.)). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия (0,5 кг, 50 масс.%), затем фильтровали и промывали этилацетатом (0,37 кг, 0,37 (масс./масс.)). Концентрировали раствор с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. Полученное маслянистое вещество растворяли в изопропиловом спирте (2 л, 2 объема) и концентрировали полученный раствор с получением маслянистого вещества в вакууме при температуре ниже 45°C. Полученное маслянистое вещество растворяли в изопропиловом спирте (1,2 л, 1,2 объема) и неочищенный раствор титульного соединения использовали непосредственно на следующей стадии очистки. ИЭР/МС m/z 374,2 (M+H).

В 1000 мл круглодонную колбу помещали раствор *трет*-бутил-4-((S)-1-(4-((S)-1-аминоэтил)фенил)-2-циклопропилэтил)пиперазин-1-карбоксилата (30,0 г, 1,0 экв.) в изопропиловом спирте (270 мл, 9 объемов). В перемешиваемый раствор при 20–30°C добавляли L-дibenзоилвинную кислоту (L-DBTA, 34,5 г, 1,2 экв.). Перемешивали раствор при 20–30°C в течение 2–4 часов. Полученную взвесь оставляли перемешиваться на 8–12 часов при 20–30°C. В светлую взвесь помещали МТБЭ (300 мл, 10 объемов). Полученную взвесь оставляли перемешиваться и загустевать при 20–30°C на 12–16 часов. Затем собирали твердое вещество путем фильтрования и промывали МТБЭ (150 мл, 5 объемов). Твердое вещество сушили при пониженном давлении при 45–55°C в течение 12 часов с получением соли *трет*-бутил-4-((S)-1-(4-((S)-1-аминоэтил)фенил)-2-циклопропилэтил)пиперазин-1-карбоксилата и L-дibenзоилвинной кислоты в виде белого твердого вещества (48,8 г, выход 83%, д.о. >98:2).

В перемешиваемую 1000 мл круглодонную колбу помещали соль *трет*-бутил-4-((S)-1-(4-((S)-1-аминоэтил)фенил)-2-циклопропилэтил)пиперазин-1-карбоксилата и L-дibenзоилвинной кислоты (40,0 г, 1,0 экв.), затем дихлорметан (400 мл, 10 объемов). В перемешиваемый раствор при 15–25 °C добавляли 10% водный раствор Na₂CO₃ (количество, достаточное для доведения pH до 8–10, примерно 6–8 объемов). Перемешивали двухфазную смесь в течение 1 часа при 15–25°C, а затем разделяли слои в делительной воронке. В органический слой добавляли ДМСО (240 мл, 6 объемов). Концентрировали раствор при пониженном давлении и температуре ниже 40°C для удаления дихлорметана. Раствор свободного основания *трет*-бутил-4-((S)-1-(4-((S)-1-аминоэтил)фенил)-2-циклопропилэтил)пиперазин-1-карбоксилата в ДМСО использовали непосредственно на следующей стадии.

Пример получения 63

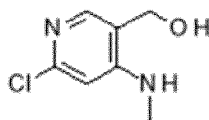
Этил-6-хлор-4-(метиламино)пиридин-3-карбоксилат



В раствор этил-4,6-дихлорпиридин-3-карбоксилата (20 г, 92 ммоль) в ацетонитриле (300 мл) при 0°C по каплям добавляли метиламин (16 мл, 11,6 ммоль/л в воде, 186 ммоль). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры на 2 часа. В реакционную смесь добавляли воду и этилацетат и экстрагировали водный слой этилацетатом. Объединенные органические экстракты сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха. Полученное неочищенное вещество очищали 5
10 путем хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc/гексаны) с получением после концентрирования соответствующих фракций этил-6-хлор-4-(метиламино)пиридин-3-карбоксилата в виде белого твердого вещества (10,46 г, 52,14 ммоль, выход 57%). МС (m/z): 201 (M+H).

Пример получения 64

15 [6-хлор-4-(метиламино)-3-пиридил]метанол

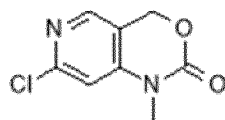


В смесь алюмогидрида лития (78,2 мл, 1,0 моль/л в ТГФ, 78,2 ммоль) по каплям добавляли раствор этил-6-хлор-4-(метиламино)пиридин-3-карбоксилата (10,46 г, 52,14 ммоль) в ТГФ (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до 20 комнатной температуры на 1,5 часа. В реакционную смесь последовательно добавляли воду (3 мл), 15% водный NaOH (3 мл) и снова воду (9 мл). После перемешивания фильтровали реакционную смесь через подложку Celite. Разбавляли фильтрат водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические экстракты сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением [6-хлор-4-
25 (метиламино)-3-пиридил]метанола в виде бледно-желтого твердого вещества (2,78 г, выход 27%). Осадок на фильтре с Celite дополнительно промывали метанолом и

концентрировали фильтрат досуха. Собирали твердые вещества из осадка и перемешивали с дихлорметаном и фильтровали через Celite. Объединяли фильтрат с остатком после промывки метанолом, концентрировали вещество досуха и сохраняли вещество. К собраным после фильтрования твердым веществам добавляли смесь 4:1
5 хлороформ:изопропиловый спирт и перемешивали смесь в течение ночи. Фильтровали смесь через подложку Celite, объединяли фильтрат с сохраненным остатком и концентрировали досуха с получением дополнительного количества [6-хлор-4-(метиламино)-3-пиридил]метанола в виде бледно-желтого твердого вещества (5,07 г, выход 56%).
10 Общее количество выделенного [6-хлор-4-(метиламино)-3-пиридил]метанола составляло 7,85 г, выход 83%. МС (m/z): 173 (M+H).

Пример получения 65

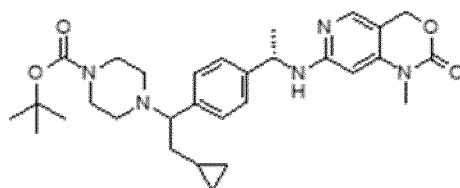
7-хлор-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-он



В раствор [6-хлор-4-(метиламино)-3-пиридил]метанола (5,07 г, 29,1 моль) и DIPEA
15 (51,2 мл, 291 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли трифосген (6,04 г, 20,4 моль) при -20°C. Удаляли охлаждающую баню и оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры. Через 30 минут добавляли воду и экстрагировали смесь дихлорметаном. Объединенные органические экстракты сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха. Полученное неочищенное вещество очищали путем хроматографии на силикагеле
20 (0-100% EtOAc/гексаны) с получением после концентрирования соответствующих фракций 7-хлор-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-она в виде оранжевого твердого вещества (5,13 г, 24,5 ммоль, выход 84%). МС (m/z): 199 (M+H).

Пример получения 66

Трет-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-метил-2-оксо-4Н-пиридо[4,3-
25 d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилат, диастереомер 1



В раствор *трет*-бутил-4-[1-[4-[(1S)-1-аминоэтил]фенил]-2-циклопропилэтил]-пиперазин-1-карбоксилата (1,30 г, 3,48 ммоль), 7-хлор-1-метил-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-2-она (864 мг, 4,35 ммоль) и карбоната цезия (2,27 г, 6,96 ммоль) в толуоле (17,4 мл) в атмосфере азота добавляли дихлор[1,3-бис(2,6-ди-3-пентилфенил)имидазол-2-илиден](3-хлорпиридил)палладий (II) (291 мг, 0,348 ммоль) и грели смесь при 75°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры фильтровали смесь через небольшую колонку с силикагелем и элюировали этилацетатом. Концентрировали фильтрат при пониженном давлении и очищали полученный остаток путем хроматографии на силикагеле (20-100% EtOAc/гексаны). Смешанные фракции повторно очищали путем хроматографии на силикагеле (50-100% метил-трет-бутиловый эфир/гексаны) и концентрировали объединенные чистые фракции из обеих колонок с получением *трет*-бутил-4-[2-циклопропил-1-[4-[(1S)-1-[(1-метил-2-оксо-4Н-пиридо[4,3-d][1,3]оксазин-7-ил)амино]этил]фенил]этил]пиперазин-1-карбоксилата, диастереомер 1, в виде беловатой пены (1,312 г, 2,400 ммоль, выход 69%). МС (m/z): 536 (M+).

Рак все чаще рассматривают как гетерогенную совокупность заболеваний, появление и прогрессирование которых индуцируется нарушением функции одного или более генов, которые регулируют репарацию ДНК, стабильность генома, пролиферацию клеток, гибель клеток, адгезию, ангиогенез, инвазию и метастазирование в клеточное и тканевое микроокружения. Изменение или нарушение функции «раковых» генов может являться результатом естественного полиморфизма ДНК, изменений числа копий генома (посредством амплификации, делеции, утраты хромосом или дупликации), изменений в структуре генов и хромосом (через транслокацию инверсию или другую перестройку хромосом, которые приводят к нерегулируемой экспрессии генов) и точечных мутаций. Раковые новообразования могут быть индуцированы одной нарушенной функцией гена и поддерживаться той же нарушенной функцией гена, или их поддержание и прогрессирование усугубляются дополнительными нарушенными функциями гена.

Помимо генетических хромосомных aberrаций, упомянутых выше, каждый из видов рака может также включать эпигенетические модификации генома, включая метилирование ДНК, геномный импринтинг и модификацию гистонов путем ацетилирования, метилирования или фосфорилирования. Эпигенетическая модификация может влиять на появление и/или поддержание злокачественного образования.

В сети Интернет были составлены обширные каталоги цитогенетических aberrаций при раковых заболеваниях у человека, которые поддерживаются и регулярно обновляются (см. Базу данных хромосомных aberrаций при раке Mitelman на сайте

Проекта по анатомии ракового генома США (CGAP)). В реализованном в сети Интернет проекте ракового генома в Wellcome Trust Sanger Institute поддерживается подробная база данных «Cancer Gene Census» всех человеческих генов, которые имеют причинную связь с онкогенезом, а также база данных COSMIC (Каталог соматических мутаций при раке) соматических мутаций при раке человека. Еще одним источником, в котором содержится обширная информация о цитогенетических изменениях, имеющих причинную связь с различными видами рака, является Атлас генетики и цитогенетики в онкологии и гематологии.

Диагностика раковых злокачественных образований при помощи биопсии, иммунофенотипирования и других исследований известна и постоянно используется. Помимо высокоразрешающего бэндинга хромосом и перспективных технологий визуализации хромосом, хромосомные aberrации в случаях, при которых подозревают наличие рака, могут быть определены путем цитогенетического анализа, такого как флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), кариотипирование, спектральное кариотипирование (SKY), мультиплексная FISH (M-FISH), сравнительная геномная гибридизация (CGH), матрицы однонуклеотидного полиморфизма (чипы SNP) и другие диагностические и аналитические исследования, известные и используемые специалистами в данной области техники.

Мутации IDH1 и IDH2 были выявлены при различных типах раковых опухолей, включая, но не ограничиваясь ими, глиому, мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Dang et al., *Trends Mol. Med.*, 2010, 16: 387-397; Ward et al., *Oncogene*, 2012, 31(19): 2491-2498; меланому, Shibata et al., *Am. J. Pathol.*, 2010, 178(3): 1395-1402; рак предстательной железы, Flaherty et al., *J. Clin. Oncol.*, 2014, 32 (доп. 4; реферат 213); Cairns et al., *Cancer Discovery*, 2013, 3: 730-741; хондросаркому и холангиокарциному, Balss et al., *Acta Neuropathol.*, 2012, 124: 883-891; Cairns et al., *Cancer Discovery*, 2013, 3: 730-741; ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), Cairns et al. *Blood*, 2012. 119(8):1901-1903. Мутации были обнаружены в конкретных остатках активного сайта или рядом с ними: G97D, R100, R132H, R132C, R132S, R132V, R132G, V71I, R132L и G123R в случае IDH1, Dang et al., *Trends Mol. Med.*, 2010, 16: 387-397; Ward et al., 2012, и дополнительная таблица 2.

Было показано, что мутантные формы IDH1 и IDH2 обладают неоморфной активностью (приобретение функции) восстановления α -кетоглутарата до 2-

гидроксиглутарата. Эндогенная выработка 2-гидроксиглутарата является энантиоспецифической и приводит к образованию D-энантиомера (также называемого (R)-энантиомером). Обычно клетки имеют низкий уровень 2-гидроксиглутарата, при этом для клеток с мутациями IDH1 или IDH2 установлено значительное увеличение уровня 2-гидроксиглутарата. Значительно повышенные уровни 2-гидроксиглутарата обнаружены в опухолях, содержащих мутации, и в плазме пациентов с мутантными IDH1 или IDH2. Высокие уровни 2-гидроксиглутарата связаны с фенотипом гиперметилирования, вызывающим блокирование дифференцировки, что приводит к усилению онкогенеза.

Активность специфического необратимого ковалентного ингибитора определяется его связыванием с мишенью (IDH1 или IDH2), определяемым K_i и максимальной потенциальной скоростью образования ковалентной связи, определяемой k_{inact} . Эти два фактора не работают отдельно друг от друга, но, напротив, совместно обеспечивают желаемый эффект образования ковалентных связей. Это проиллюстрировано следующими 3 пунктами.

Во-первых, тот факт, что электрофил, например, акриламид, должен быть правильно расположен относительно нуклеофила, например, цистеина, является фундаментальным компонентом для образования ковалентных связей в органической химии. Существует точный угол и расстояние, на которое нуклеофил должен приблизиться к электрофилу, чтобы образовалась ковалентная связь. Простого размещения электрофила рядом с нуклеофилом недостаточно для образования ковалентной связи.

Во-вторых, при встраивании реакционноспособной группы в ядро, которое содержит фрагменты, образующие водородные связи, для стабилизации связывания ингибитора с ферментом, например, ориентирующее ядро, специалист должен учитывать, каким образом ориентирующее ядро связывается с мишенью и позиционирует электрофил относительно нуклеофила, с учетом оптимального угла и расстояния, указанных выше. Снова, простого размещения электрофила рядом с нуклеофилом недостаточно для образования ковалентной связи. Изменения в ориентирующем ядре могут влиять на способность ингибирующего соединения образовывать ковалентную связь.

В-третьих, если рассматривать сразу оба приведенных выше пункта, то исключительно сам факт наличия электрофильного фрагмента на ориентирующем ядре является недостаточным, чтобы предположить возможность образования ковалентной связи.

В следующих исследованиях *in vitro* и *in vivo* продемонстрирована ингибирующая активность и эффективность исследуемых соединений формулы I или Ia в отношении мутантных белков IDH1 и IDH2 при использовании различных специфических раковых клеточных линий. Специалисты в данной области техники в общем случае признают, что данные исследования позволяют судить о клинической терапевтической активности у человека. Полагают, что ингибирование мутантных IDH1 или IDH2 неоморфных белков в описанных исследованиях также будет эффективным в отношении других мутантных IDH1 и IDH2 неоморфных белков. Исследования, подтверждающие ингибирующую активность и эффективность в отношении IDH1 или IDH2, можно проводить по существу, как описано далее, или в рамках схожих исследований с получением схожих данных.

Результаты следующих исследований демонстрируют, что предложенные и исследуемые соединения можно применять в качестве ингибиторов мутантных IDH1 и IDH2 и использовать в лечении раковых заболеваний, при которых происходит экспрессия мутантных IDH1 или IDH2.

Биохимические исследования мутантных ферментов IDH1 и IDH2

Мутантные ферменты IDH1-R132H, IDH1-R132C, IDH2-R172K и IDH2-R140Q катализируют конверсию α KG в 2HG. 2HG анализировали путем совместной твердофазной экстракции и масс-спектрометрии. Указанный анализ проводили на оборудовании RapidFire®, подключенном к тройному квадрупольному масс-спектрометру 6460 (G6460A Agilent).

Мутантные белки IDH1 (R132H и R132C) и мутантные белки IDH2 (R140Q и R172K), содержащие N-концевую His-метку, экспрессировали в *E.coli* и очищали путем аффинной хроматографии на никеле. Ферментные исследования проводили в 96-луночных полипропиленовых планшетах с V-образным дном, содержащих 100 мМ буфер Tris-HCl, 1 мМ DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 мМ NaCl. В случае IDH1 R132H использовали α -кетоглутарат, НАДФН и $MnCl_2$ в конечных концентрациях 300 мкМ, 2,5 мкМ и 300 мкМ, соответственно. В случае IDH1 R132C использовали α -кетоглутарат, НАДФН и $MnCl_2$ в конечных концентрациях 100 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ, соответственно. В случае IDH2 R172K использовали α -кетоглутарат, НАДФН и $MnCl_2$ в конечных концентрациях 150 мкМ, 10 мкМ и 150 мкМ, соответственно. В случае IDH2 R140Q использовали α -кетоглутарат, НАДФН и $MnCl_2$ в конечных концентрациях 3000 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ, соответственно. Конечный pH = 7,0. Исследуемое соединение, растворенное в маточном растворе ДМСО, разбавляли в реакционной смеси до конечной

концентрации ДМСО 4%. Соединения исследовали в формате определения зависимости доза-ответ. Исследование начинали путем добавления фермента. Ферменты использовали в следующих конечных концентрациях: IDH1 R132H, 2 нМ; IDH1 R132C, 0,5 нМ; IDH2 R172K, 1,2 нМ; IDH2 R140Q, 1,2 нМ. Через 90 минут реакцию гасили путем добавления ACN (50:50), содержащего 3-гидрокси-1,5-пентандиовую-2,2,3,4,4-d₅ кислоту (5d₅-3HG), в качестве внутреннего стандарта для масс-спектрометрического анализа и количественного определения продукта реакции. В погашенных образцах выделяли 2-гидроксиглутарат (2HG) путем сильной анионообменной колоночной хроматографии (Phenomenex Strata-X-A SecurityGuard) и анализировали путем масс-спектрометрии на тройном квадрупольном масс-спектрометре 6460 (G6460A Agilent). Обнаруженный сигнал 2HG переводили в концентрацию анализируемого соединения с использованием калибровочной кривой, полученной для известных концентраций 2HG. Для каждого исследуемого соединения вычисляли ингибирование в %, принимая значение в контрольном образце с ДМСО за 0% ингибирование и в контрольном образце без фермента за 100% ингибирование. Значения IC₅₀ получали на основании отдельных значений ингибирования в % для различных концентраций соединения при помощи 4-параметрового уравнения. Эти расчеты выполняли с использованием программ анализа данных Activity Base (IDBS) или Screener (Genedata).

Результаты указанного исследования демонстрируют, что предложенные исследуемые соединения ингибируют активность мутантов IDH1 IDH1/R132H и IDH1/R132C и активность мутантов IDH2 IDH2/R140Q и IDH2/R172K.

Следующие примеры исследовали, по существу, как описано выше, и они имели активность в отношении мутантной IDH1 и мутантной IDH2, такую как показано ниже в таблице 14.

Таблица 14

№ примера	IDH1/R132H IC ₅₀ (мкМ)	IDH1/R132C IC ₅₀ (мкМ)	IDH2/R140Q IC ₅₀ (мкМ)	IDH2/R172K IC ₅₀ (мкМ)
1	0,00569 ± 0,000766, n=3	0,00431 ± 0,000895, n=3	0,113	0,0328
2	0,00627 ± 0,00127, n=3	0,00371 ± 0,00126, n=3	0,0369	0,0115
3	0,0111 ± 0,0035, n=2	0,0156 ± 0,0075, n=2	0,0648	0,0156

№ примера	IDH1/R132H IC ₅₀ (мкМ)	IDH1/R132C IC ₅₀ (мкМ)	IDH2/R140Q IC ₅₀ (мкМ)	IDH2/R172K IC ₅₀ (мкМ)
4	0,0137 ± 0,0030, n=2	0,00869 ± 0,00280, n=2	0,0811	0,028
5	0,00276	0,00249		
6	0,00491	0,00505		
7	0,00638	<0,00508	0,0743	0,0224
8	<0,00508	<0,00508	0,046	0,017
9	0,00743 ± 0,00188, n=2	0,0151 ± 0,0024, n=2		
10	0,0139 ± 0,0017, n=2	0,0165 ± 0,0019, n=2		
11	0,00978 ± 0,00038, n=2	0,0156 ± 0,0034, n=2	0,0543	0,02
12	0,0294 ± 0,0331, n=2	0,0390 ± 0,0629, n=2	0,134	0,0263
13	0,0124 ± 0,0105, n=2	0,0166 ± 0,0055, n=2	0,239	0,039
14	0,0190 ± 0,0224, n=2	0,0186 ± 0,0176, n=2	0,746	0,162

Среднее ± стандартное отклонение от среднего.

Биохимические исследования ферментов IDH1 и IDH2 дикого типа

Ферменты IDH1 и IDH2 катализируют конверсию изоцитрата в αKG. Белки дикого
5 типа IDH1 (National Center for Biotechnology Information, № в каталоге: NP_001269316.1) и
IDH2 (National Center for Biotechnology Information, № в каталоге: EAX02082.1),
содержащие N-концевую His-метку, экспрессировали в E. coli и очищали путем аффинной
хроматографии на никеле. Ферментные исследования проводили в 96-луночных
полипропиленовых планшетах с V-образным дном, содержащих 100 мМ буфер Tris-HCl,
10 pH 7,5, 1 мМ DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 мМ NaCl. В исследовании IDH1 дикого
типа использовали изоцитрат, НАДФ⁺ и MnCl₂ в концентрациях 85 мкМ, 50 мкМ и 20
мкМ, соответственно. В исследовании IDH2 дикого типа использовали изоцитрат, НАДФ⁺

и $MnCl_2$ в концентрациях 30 мкМ, 50 мкМ и 10 мкМ, соответственно. Ингибиторы, растворенные в маточном растворе ДМСО, разбавляли в реакционной смеси до конечной концентрации ДМСО 4%. Ферментное исследование обрывали (гасили реакцию) путем добавления ACN (50:50), содержащего d6-2-кетопентандиовую кислоту (d6- α KG), в качестве внутреннего стандарта для масс-спектрометрического анализа. Десять микролитров реакционной смеси объединяли с 100 мкл воды, 50 мкл 1 М О-бензилгидроксиламина в пиридиновом буфере (8,6% пиридина, pH 5) и 50 мкл 1 М гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (EDC) в пиридиновом буфере. После проведения дериватизации при комнатной температуре в течение одного часа экстрагировали образцы 600 мкл EtOAc. Удаляли четыреста мкл верхнего слоя, сушили в горячем азоте и повторно растворяли в 100 мкл смеси MeOH/вода (1:1). Десять мкл дериватизированного образца вводили в систему ЖХ-МС, состоящую из системы ВЭЖХ Shimadzu Prominence 20A и тройного квадрупольного масс-спектрометра Thermo Quantum Ultra™. Анализируемые соединения разделяли на колонке Waters XBridge™ C18 column (2,1 x 50 мм, 3,5 мкм), расход 0,6 мл/минута. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла собой MeOH. Обнаруженный сигнал α KG переводили в концентрацию анализируемого соединения с использованием калибровочной кривой, построенной для известных концентраций α KG. Для каждого исследуемого соединения вычисляли ингибирование в %, принимая значение в контрольном образце с ДМСО за 0% ингибирование и в контрольном образце без фермента за 100% ингибирование. Значения IC_{50} получали на основании отдельных значений ингибирования в % для различных концентраций соединения при помощи 4-параметрового уравнения. Эти расчеты выполняли с использованием программ анализа данных Activity Base (IDBS) или Screener (Genedata).

Результаты указанного исследования демонстрируют, что предложенные исследуемые соединения имели меньшую активность ингибирования фермента IDH1 дикого типа по сравнению с мутантными ферментами IDH1 R132H или R132C и меньшую активность ингибирования фермента IDH2 дикого типа по сравнению с мутантными ферментами IDH2 R140Q или R172K.

Следующие примеры, приведенные в таблице 15, исследовали, по существу как описано выше, и они имели меньшую активность ингибирования ферментов дикого типа по сравнению с мутантными ферментами.

Таблица 15

№ примера	IDH1 дикого типа IC ₅₀ (мкМ)	IDH2 дикого типа IC ₅₀ (мкМ)
1	0,0854 ± 0,107, n=2	0,801 ± 0,745, n=2
2	0,105 ± 0,113, n=2	0,884 ± 0,748, n=2
3	0,425	3,37
4	0,302	3,7
6	0,0549	0,493
7	0,233	1,53
8	0,237	1,62
11	0,345	2,08
12	0,277	3,22
13	0,456	7,03
14	0,392	7,4

Биохимическое исследование резкого разбавления IDH1 (R132H)

5 Лиофилизированные предложенные соединения повторно растворяли в концентрации 10 мМ или 100 мМ в 100% ДМСО и выдерживали при комнатной температуре до исследования. Белок IDH1(R132H)-His экспрессировали и очищали способами, хорошо известными и широко используемыми специалистами в данной области техники. Реагенты для исследования включали следующее: α-кетоглутаровую
 10 кислоту (Sigma, кат.№ K1875), MnCl₂ - Fisher Scientific, кат.№ M87-100, НАДФН - Sigma-Aldrich, кат.№ N7505, Tris-HCl (Invitrogen, кат.№15567-027), NaCl (Sigma, S3014), дитиотреитол (Sigma, D5545) и TRITON™ X100 (Peirce, 28314). Использовали набор NAD(P)H-Glo™ Kit производства Promega (G9061).

15 Используемый буфер для исследования содержал 100 мМ Tris-HCl pH 7,0, 120 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,005% TRITON™ X-100 и 2% ДМСО (после добавления исследуемого соединения). Значение IC₅₀ для каждого соединения определяли путем инкубации соединения, для которого определяют зависимость доза-ответ, полученного на Echo555, с 1,5 нМ IDH1(R132H), 1 мМ α-кетоглутарата, 1 мМ MnCl₂ и 15 мкМ НАДФН в буфере для исследования. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем останавливали реакцию при помощи 6-циклопропил-5-(изохинолин-5-ил)-2-[(3R)-4-(3-метоксипропаноил)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридин-3-карбонитрила
 20 (10 мкМ). Концентрацию НАДФН измеряли при помощи набора NAD(P)H-Glo™ Kit в соответствии с рекомендациями поставщика. Сигнал люминесценции анализировали на Envision (Perkin Elmer; 0,1 с/люминесцентное зеркало/фильтр Lum700 WL400-700). В последующем эксперименте резкого разбавления соединение в концентрации,

эквивалентной $10\times$ от IC_{50} , предварительно инкубировали с 100 нМ IDH1(R132H). Концентрация соединения всегда превышала концентрацию фермента или была равна ей. После выдерживания в течение 2 часов при комнатной температуре полученную смесь разбавляли 1:100 в растворе, содержащем α -кетоглутарат (10 мМ), $MnCl_2$ (10 мМ) и НАДФН (15 мкМ). Полученная конечная ферментная реакционная смесь содержала 1 нМ IDH1(R132H) и $0,1 \times [IC_{50}]$. После 2-часовой инкубации при комнатной температуре измеряли концентрацию НАДФН, как указано выше, с использованием 6-циклопропил-5-(изохинолин-5-ил)-2-[(3R)-4-(3-метоксипропаноил)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридин-3-карбонитрила и набора NAD(P)H-Glo™ Kit. Использовали три контроля: 1) “ $10\times$ контроль”, содержащий соединение в концентрации $10\times IC_{50}$ во время предварительной инкубации и исследования фермента с тем исключением, что 1 мМ α -кетоглутарат, 1 мМ $MnCl_2$ и 15 мкМ НАДФН использовали в конечном исследовании для измерения активности фермента, 2) “контроль с тах активностью”, содержащий ДМСО вместо соединения во время предварительной инкубации и ферментного исследования, и 3) “ $0,1\times$ контроль”, содержащий ДМСО вместо соединения во время предварительной инкубации и соединения в концентрации $0,1\times IC_{50}$ во время ферментного исследования. Использовали “контроль с min активностью”, который во всем был эквивалентен «контролю с тах активностью», но в котором отсутствовал фермент. Вторую серию контрольных опытов с тах и min активностью проводили с использованием 1 мМ α -кетоглутарата, 1 мМ $MnCl_2$ и 15 мкМ НАДФН. Каждое условие исследовали в трех повторностях, проводили 32 контрольных опыта с тах активностью (10 мМ) и min активностью (10 мМ), в то же время проводили 16 контрольных опытов с тах активностью (1 мМ) и min активностью (1 мМ).

Концентрацию НАДФ (продукта), образующегося в каждом эксперименте/контрольном опыте, определяли по уменьшению в процентах наблюдаемого сигнала по сравнению с контролем с min активностью, содержащим 15 мкМ НАДФН. Определяли средние значения для контроля с min активностью (1 мМ и 10 мМ) и контроля с тах активностью (1 мМ и 10 мМ) и вычисляли стандартное отклонение для каждого полученного значения. Сигнал для каждого эксперимента с резким разбавлением и $0,1\times$ контроля умножали на 15, затем делили на среднее значение в контрольных лунках с min активностью (10 мМ). Полученное значение вычитали из 15 для вычисления концентрации НАДФ (мкМ продукта). Такие же расчеты проводили для $10\times$ контролей, но использовали значения для контроля с min активностью (1 мМ). Количество мкмоль продукта в контрольных опытах с тах активностью (1 мМ и 10 мМ) вычисляли путем умножения среднего значения на 15 и последующего деления на соответствующие значения для контролей с min активностью (1 мМ и 10 мМ). Значения концентрации

НАДФ в мкМ для каждой лунки делили на среднее значение контроля с тах активностью (1 мМ или 10 мМ), затем умножали на 100 для определения активности IDH в % для резко разбавленного соединения, 10× контроля и 0,1× контроля. Эффективное соединение должно иметь активность <30% относительно 10× контроля – это указывает на то, что концентрация при предварительной инкубации является достаточной для насыщения фермента соединением. Кроме того, соединение должно иметь активность >70-80% относительно 0,1× контроля для подтверждения отсутствия ингибирования при 0,1×/концентрации разбавленного соединения.

Предложенные соединения исследовали, по существу как описано выше, и в этом исследовании для них были получены значения восстановления активности IDH1/R132H в %. Предложенные исследуемые соединения согласно настоящему изобретению ингибировали фермент через 2 часа после разбавления в отличие от соединения(-ий), известного(-ых) из уровня техники, которые не ингибировали фермент через 2 часа после разбавления и обеспечивали % восстановления активности. Данные, полученные в указанном исследовании, демонстрируют, что действие исследуемых соединений согласно настоящему изобретению соответствует ковалентному ингибированию мутантной IDH1, так как разбавление ингибитора не приводит к восстановлению активности фермента.

Клеточные исследования ингибиторов мутантной IDH1

Для исследования ингибирования мутанта IDH1 R132C в клетке использовали клеточную линию фибросаркомы HT1080 (которую приобретали в ATCC). Для исследования ингибирования мутанта R132H в клетке клеточную линию глиомы U87MG (ATCC) устойчиво трансфицировали конструктом ДНК, экспрессирующим мутантный фермент R132H, способами, хорошо известными и обычно используемыми специалистами в данной области техники.

Клеточное исследование HT1080:

Пятнадцать тысяч клеток помещали в 96-луночные планшеты с покрытием поли-D-лизина (15000 клеток/лунка) за 18-24 часа перед обработкой соединениями. За четыре часа до обработки соединением прекращали доступ глутамина к клеткам путем удаления обычной среды и замены ее на среду, не содержащую глутамин. После периода голодания клетки обрабатывали различными концентрациями исследуемых соединений (от 20 мкМ до 1 нМ; или от 0,2 мкМ до 0,01 нМ), растворенных в не содержащей глутамин среде, содержащей ДМСО в конечной концентрации 0,2%. Начальную инкубацию соединения

проводили в течение 1 часа при 37°C/5% CO₂. Через 1 час добавляли глутамин до конечной концентрации 2 mM, а затем инкубировали обработанные клетки еще 18 часов при 37°C/5% CO₂. После 18-часовой инкубации анализировали внутриклеточный уровень 2HG и αKG в клеточных лизатах. Лизаты получали путем удаления среды и добавления к клеткам буфера, содержащего 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА/1% TRITON™-X 100. Аликвоту лизата добавляли в смесь d₆-αKG и d₅-3HG, используемых в качестве внутренних стандартов, и обрабатывали смесь O-бензилгидроксиламином в присутствии гидрохлорида *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида (EDC) и пиридина. Затем экстрагировали производные анализируемых соединений EtOAc, сушили, после чего перерастворяли в 50% MeOH в H₂O. Полученные согласно описанию образцы вводили в систему ВЭЖХ для разделения производных 2HG и αKG (и соответствующих внутренних стандартов) путем обращенно-фазовой хроматографии на колонке C18. Анализ образцов проводили на тройном квадрупольном масс-спектрометре 6460 (G6460A Agilent). Обнаруженные сигналы 2HG и αKG переводили в концентрацию анализируемого соединения при помощи отношения αKG/d₆-αKG и отношения 2HG/d₅-3HG, которые экстраполировали с использованием калибровочной кривой. Ингибирование в процентах для каждого отдельного образца определяли после нормирования вычисленных концентраций 2HG или αKG по максимальным и минимальным сравнительным значениям в присутствии глутамин и без него, полученным во время обработки клеток соединениями. Значения IC₅₀ получали на основании отдельных значений ингибирования в % с использованием 4-параметрового уравнения сигмоидальной зависимости доза-ответ. Эти расчеты выполняли автоматически с использованием программ анализа данных Activity Base (IDBS) или Screener (Genedata).

Результаты указанного исследования демонстрируют, что исследуемые примеры, указанные в таблице 15, подавляли выработку 2-гидроксиглутарата, это указывает на ингибирование мутанта IDH1 R132C в клетках в указанном исследовании. Уровень αKG, метаболита, вырабатываемого IDH1 дикого типа, не изменяется под действием ингибиторов, это указывает на то, что соединения являются селективными в отношении мутантной IDH1, но не IDH1 дикого типа в клетках в указанном исследовании. Значения IC₅₀, полученные для следующих примеров, показаны в таблице 16. Для исследований, в которых кривая ингибирования не достигала значения 50%, показана максимальная исследуемая концентрация (например, IC₅₀ >20 мкМ или >0,2 мкМ).

Таблица 16

№ примера	HT1080 (R132C, 2-гидроксиглутарат) IC ₅₀ (мкМ)	HT1080 (R132C, αKG) IC ₅₀ (мкМ)
1	0,000698 ± 0,000352, n=7	>20,0
2	0,00128 ± 0,00100, n=8	>20,0
3	0,00127 ± 0,00044, n=2	>0,200
4	0,00334 ± 0,00140, n=2	>0,200
5	0,000623 ± 0,000745, n=2	>20,0
6	0,00112 ± 0,00052, n=4	19,2
7	0,000625 ± 0,000182, n=2	>0,200
8	0,000775 ± 0,0000981, n=2	>0,200
9	0,00275 ± 0,00046, n=3	>20,0
10	0,00391 ± 0,00259, n=3	>20,0
11	0,00104 ± 0,00050, n=4	>20,0
12	0,00272 ± 0,00330, n=4	>20,0
13	0,000987 ± 0,000009, n=2	>20,0
14	0,00138 ± 0,00015, n=3	>20,0

Среднее ± стандартное отклонение от среднего.

Клеточное исследование U87MG/IDH1R132H

Клетки помещали в 96-луночные планшеты с покрытием поли-D-лизина (12000 клеток/лунка) за 18-24 часа перед обработкой соединениями. За четыре часа до обработки соединением прекращали доступ глутамина к клеткам путем удаления обычной среды и замены ее на среду, не содержащую глутамин. После периода голодания клетки обрабатывали различными концентрациями исследуемых соединений (от 20 мкМ до 1 нМ), растворенных в не содержащей глутамин среде, содержащей ДМСО в конечной концентрации 0,2%. Начальную инкубацию соединения проводили в течение 1 часа при 37°C/5% CO₂. Через 1 час добавляли глутамин до конечной концентрации 2 мМ, а затем инкубировали обработанные клетки еще 18 часов при 37°C/5% CO₂. Внутриклеточный уровень 2HG анализировали в клеточных лизатах, полученных после удаления среды и обработки лизисным буфером (25 мМ Tris-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА/1% TRITON™-X 100). Клеточные лизаты хранили при -80°C до обработки. Для экстракции анализируемого соединения аликвоту размороженного лизата переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками и обрабатывали холодным MeOH, содержащим d₅-3HG, в качестве внутреннего стандарта, затем хлороформом и H₂O (1:4:3:2). Собирали верхнюю фазу после разделения и вводили в систему ВЭЖХ для отделения 2HG (и внутреннего стандарта) путем хроматографии гидрофильных

взаимодействия (HILIC), соединенную с тройным квадрупольным масс-спектрометром 6460 для МС/МС детектирования. Ингибирование в процентах для каждого отдельного образца определяли после нормирования вычисленных концентраций 2HG по максимальным и минимальным сравнительным значениям в присутствии глутамина и без него, полученным во время обработки клеток соединениями. Значения IC₅₀ получали на основании отдельных значений ингибирования в % с использованием 4-параметрового уравнения сигмоидальной зависимости доза-ответ. Эти расчеты выполняли автоматически с использованием программ анализа данных Activity Base (IDBS) или Screener (Genedata).

Следующие примеры исследовали, по существу как описано выше, и в настоящем исследовании они имели активность ингибирования мутанта IDH1/R132H в клетках U87MG, такую как показано ниже в таблице 17.

Таблица 17

№ примера	U87MG (IDH1/R132H 2-гидроксиглутарат IC ₅₀ (мкМ)
1	0,000209 ± 0,000100, n=6
2	0,000406 ± 0,000375, n=8
3	0,000426 ± 0,000188, n=2
4	0,000805 ± 0,000187, n=2
5	0,000295 ± 0,00200, n=2
6	0,000379 ± 0,000202, n=2
7	0,000356 ± 0,000178, n=2
8	0,000432 ± 0,000016, n=2
9	0,000388 ± 0,000703, n=2
10	0,000529 ± 0,000356, n=2
11	0,000258 ± 0,000209, n=3
12	0,00135 ± 0,00151, n=4
13	0,000267 ± 0,000227, n=2
14	0,000353 ± 0,000483, n=2

Среднее ± стандартное отклонение от среднего.

Исследование 2-гидроксиглутарата *in vivo*

Для исследования *in vivo* ингибиторов IDH1 выращивали подкожные ксенотрансплантаты опухолей у бестимусных мышей (20-22 г, Harlan Laboratories) после имплантации либо клеток HT1080 (фибросаркома, которые содержали мутант IDH1 R132C), либо клеток ТВ08 (вторичная глиобластома, которые содержали мутант IDH1 R132H). Мышам предоставляли доступ к корму и воде *ad libitum* и оставляли для акклиматизации на 1 неделю перед имплантацией клеток. Опухолевые клетки (HT1080)

или фрагменты опухоли (TB08) имплантировали в заднюю часть правого бока. В случае HT1080 имплантировали $5,0 \times 10^6$ клеток в смеси 1:1 с матригелем в конечном объеме 0,2 мл. В случае TB08 фрагменты опухоли, полученные из эксплантированных образцов опухоли, имплантировали непосредственно в заднюю часть бока. Размеры опухоли измеряли два раза в неделю при помощи штангенциркуля, а объем опухоли вычисляли по формуле $0,536 \times L \times W^2$, где L=длина, и W=ширина. Когда объем опухоли достигал 150-400 мм³, животных случайным образом распределяли по группам (n=3-6 в группе) и вводили им ингибиторы IDH1 или носитель в качестве контроля. В случае ингибиторов IDH1 соединения вводили в носитель, содержащий 1% гидроксиэтилцеллюлозы/0,25% Tween™ 80/0,05% пеногасителя или 10% аравийской камеди с 1,1 мольных эквивалента HCl. Соединения обрабатывали на ультразвуковой ванне для получения суспензии. Соединения вводили в формате миллиграмм на килограмм (mpk) при помощи перорального зонда в конечном объеме 0,2 мл. Для определения ингибирования 2HG соединения вводили два раза в день (BID) в течение 3 дней (общее количество доз = 6).

После обработки соединением умерщвляли мышей под изофлурановой анестезией путем цервикальной дислокации. Получали срезы опухолей, помещали в меченные пробирки и немедленно замораживали в жидком азоте. Опухоли хранили при -80°C перед обработкой.

Получение опухолевых лизатов

Буфер XY Lite, который получали в сверхчистой воде, содержал следующие компоненты: 25 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TRITON™ X-100, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА. К XY Lite (40 мл) добавляли 800 мкл коктейля ингибиторов протеазы и фосфатазы Холта (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, не содержащий ЭДТА, Thermo Scientific, кат.№ 78441). Перемешивали образцы на вортексе, а затем охлаждали во льду. Помечали пробирки для лизиса А с оранжевыми колпачками и помещали на штативе в лед. Помещали керамическую ступку и пестик в сухой лед для охлаждения. Квадратный лист алюминиевой фольги размером 2 × 2 дюйма (5 x 5 см) размещали на дне ступки. Образец опухоли переносили на квадратный лист фольги, расположенный в предварительно охлажденной ступке. Добавляли жидкий азот (примерно 5 мл) и оставляли испаряться для сверхбыстрого замораживания опухоли. Другой лист фольги размещали поверх опухоли и разбивали опухоль на мелкие кусочки керамическим пестиком. Измельченную опухоль быстро переносили в пробирку для лизиса. В каждую пробирку добавляли ледяной XY Lite (500 мкл) и закрывали колпачком. Затем обрабатывали опухоли на оборудовании FastPrep-24 MP Biomedicals путем двукратного переворачивания по 35 секунд на каждую операцию со скоростью, установленной в

положение 5. Затем центрифугировали образцы на Beckman Microfuge R при 4°C, 14000 об./мин, в течение 30 минут. Переносили надосадочную жидкость в предварительно охлажденный 96-луночный планшет с глубокими лунками. Оставшийся сгусток отбрасывали.

5 Анализ белка

Сначала подготавливали планшет для разбавления для использования в исследовании белка путем добавления буфера XY (145 мкл) в нестерилизованный 96-луночный планшет Corning с круглым дном лунок. В буфер добавляли опухолевый лизат (5 мкл) и осторожно перемешивали. Выдерживали планшет во льду. Последовательные разбавления стандарта BCA (Thermo Scientific кат. №23209, 2 мг/мл) проводили следующим образом: На штативе размещали пять 0,5 мл пробирок и в каждую добавляли буфер XY (60 мкл). В первую пробирку добавляли маточный раствор BCA (60 мкл) и перемешивали на вортексе. 60 мкл из первой пробирки переносили в следующую пробирку, перемешивали на вортексе и т.д., до получения следующей последовательности разбавленных растворов: пробирка 1= маточный раствор BCA, пробирки 2-5 растворы, последовательно разбавленные 1:2, пробирка 6= только буфер XY. Реагенты для исследования белка Thermo BCA Protein Assay смешивали согласно инструкциям производителя. Смешанный реагент BCA (200 мкл) добавляли к каждому образцу и инкубировали в течение 15 минут. Результаты анализа белка получали на планшетном анализаторе SOFTmax Pro Plate Reader. На основании результатов анализа белка в каждый опухолевый лизат добавляли соответствующее количество буфера XY до получения конечной концентрации белка 5 мг/мл. Все образцы метили и хранили при -80°C.

Анализ метаболитов в опухолевых лизатах

Влияние ингибирования IDH1 *in vivo* на общую концентрацию 2HG и α KG определяли в анализе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) ксенотрансплантатов опухоли. В способе применяли дериватизацию О-бензилгидроксиламином перед проведением анализа ЖХ-МС. Десять микролитров каждого опухолевого лизата помещали в 96-луночный планшет с глубокими лунками и объединяли с 100 мкл раствора внутреннего стандарта, содержащего 10 мкМ d₅-3HG и 10 мкМ d₆- α KG. В каждый образец добавляли 50 мкл 1 М О-бензилгидроксиламина в пиридиновом буфере (8,6% пиридина, pH 5) и 50 мкл 1 М гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (EDC) в пиридиновом буфере. Реакцию дериватизации проводили при комнатной температуре в течение одного часа. В каждый

образец при помощи жидкостного манипулятора Beckman Biomek FX добавляли 600 мкл EtOAc. Закрывали планшеты и перемешивали на вортексе в течение 5 минут, затем центрифугировали в течение 5 минут при 4000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5810R. 400 мкл верхнего слоя переносили в новый 96-луночный планшет. Образцы сушили в горячем азоте при 50°C и повторно растворяли в 100 мкл смеси MeOH/вода (1:1). Один микролитр дериватизированного образца вводили в систему ЖХ-МС, состоящую из системы ВЭЖХ Shimadzu Prominence 20А и тройного квадрупольного масс-спектрометра Thermo Quantum Ultra™. Анализируемые соединения разделяли на колонке Water XBridge™ C18 column (2,1 x 50 мм, 3,5 мкм), расход 0,6 мл/минута. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла собой MeOH. Профиль градиента: 0 минут, 5% В; 3 минуты, 100% В; 4,00 минуты, 100% В; 4,1 минуты, 5% В; 5,50 минуты, завершение. В масс-спектрометре использовали зонд HESI-II, работающий в режиме мониторинга реакции с отслеживанием положительных ионов. Калибровочные кривые получали путем построения графиков зависимости концентрации анализируемого соединения от отношения площадей пиков анализируемого соединения/внутреннего стандарта и проводили квадратичную аппроксимацию данных с использованием параметра взвешивания 1/концентрация при помощи программного обеспечения Xcalibur™. Концентрации анализируемого соединения в неизвестных образцах вычисляли на основании калибровочных кривых. Данные об уровне метаболитов в исследовании ЖХ-МС выражали в нмоль/мг белка. Средний уровень 2HG в группе, в которой вводили носитель, использовали как контрольное значение 0% ингибирования. Затем определяли ингибирование в % у каждого животного, которому вводили ингибитор, относительно контроля, в котором использовали носитель. Данные анализировали при помощи программного обеспечения JMP для определения среднего ингибирования в % в каждой группе, стандартного отклонения и стандартной ошибки.

Данные, демонстрирующие ингибирование *in vivo* 2-гидроксиглутарата в ксенотрансплантатах, содержащих мутант IDH1, у мышей под действием предложенных исследуемых соединений, показаны ниже в таблице 18.

Таблица 18

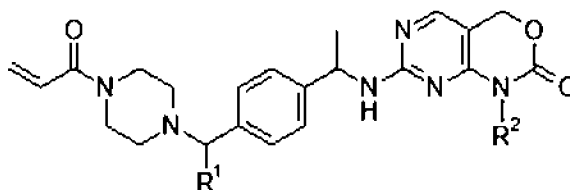
Модель ксенотрансплантата	Способ введения или № пр.	Доза	Мыши (n)	2HG, среднее ингибирование, %	СКО	СОС
TB08 (R132H)	Носитель	0 mpk	5	0	30,3	13,55

TB08 (R132H)	1	1 mpk	5	21,4	21	9,38
TB08 (R132H)	1	2 mpk	5	16,1	30,3	13,6
TB08 (R132H)	1	4 mpk	5	41,5	26	11,6
TB08 (R132H)	1	8 mpk	5	78,8	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	16 mpk	5	92,1	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	32 mpk	5	95,8	0,7	0,3
Модель ксенотрансплантата	Способ введения или № пр.	Доза	Количество мышей	2HG, среднее ингибирование, %	СКО	СОС
TB08 (R132H)	Носитель	0 mpk	5	0	39,2	17,5
TB08 (R132H)	2	1 mpk	5	37,4	13,3	5,9
TB08 (R132H)	2	2 mpk	5	23,9	16,2	7,2
TB08 (R132H)	2	4 mpk	5	63,7	12,1	5,4
TB08 (R132H)	2	8 mpk	5	80,95	6,27	2,8
TB08 (R132H)	2	16 mpk	5	92,97	2,63	1,1
TB08 (R132H)	2	32 mpk	5	96,88	0,68	0,3
Модель ксенотрансплантата	Способ введения или № пр.	Доза	Количество мышей	2HG, среднее ингибирование, %	СКО	СОС
TB08 (R132H)	Носитель	0,00 mpk	5	0	24,4	10,9
TB08 (R132H)	8	10,0 mpk	5	60,36	10,06	4,5
TB08 (R132H)	7	10,0 mpk	5	69,56	9,15	4,1
TB08 (R132H)	4	10,0 mpk	5	61,82	14,4	6,4

ТВ08 (R132H)	3	10,0 mpk	5	87,26	3,95	1,77
ТВ08 (R132H)	14	10,0 mpk	5	86,71	5,27	2,36
Модель ксенотрансплантата	Способ введения или № пр.	Доза	Количество мышей	2HG, среднее ингибирование, %	СКО	СОС
ТВ08 (R132H)	Носитель	0,00 mpk	5	0	26,87	12,02
ТВ08 (R132H)	11	10,0 mpk	5	90,63	4,5	2,01
Модель ксенотрансплантата	Способ введения или № пр.	Доза	Количество мышей	2HG, среднее ингибирование, %	СКО	СОС
ТВ08 (R132H)	Носитель	0,00 mpk	5	0	39,6	17,7
ТВ08 (R132H)	13	10,0 mpk	5	86,3	3,7	1,67
ТВ08 (R132H)	12	10,0 mpk	5	94,16	0,66	0,3

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:



где:

5 R^1 представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ или $-\text{CH}_2$ -циклопропил;

R^2 представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; или
его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, представляющее собой

10 7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 1;
15 1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он, изомер 2;
или фармацевтически приемлемую соль любого из указанных соединений.

20 3. Соединение по п.2, представляющее собой 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль.

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

25 5. Способ лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой глиому, глиобластому,

- мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, хондросаркому или холангиокарциному, у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по любому из п.п. 1-3 или его фармацевтически приемлемой соли.
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный рак, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому или глиобластому.
7. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.
8. Соединение по любому из п.п. 1-3 или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой глиому, глиобластому, мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, хондросаркому или холангиокарциному.
9. Применение по п.8, отличающееся тем, что указанный рак, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому или глиобластому.
10. Применение соединения по любому из п.п. 1-3 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения рака, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, который представляет собой глиому, глиобластому, мультиформную глиобластому, астроцитомы, олигодендроглиомы, параганглиому, фибросаркому, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (АИТЛ), миелодиспластический синдром (МДС), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), рак

щитовидной железы, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), меланому, рак предстательной железы, хондросаркому или холангиокарциному.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что указанный рак, при котором происходит экспрессия мутантной IDH1 или мутантной IDH2, представляет собой фибросаркому, острый миелоидный лейкоз, глиому или глиобластому.

5