

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992209** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.16

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(51) Int. Cl. *C07H 21/02* (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИНУКЛЕОТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) 17162392.9

(32) 2017.03.22

(33) EP

(86) PCT/EP2018/056656

(87) WO 2018/172206 2018.09.27

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

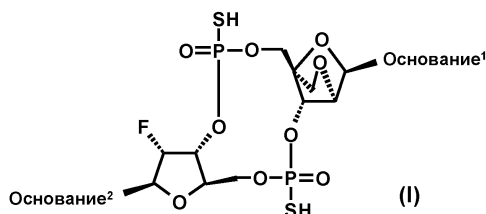
(72) Изобретатель:

**Ост Торстен, Флек Мартин, Куттруфф
Кристиан Андреас, Каротта Зебастиан
(DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Соединения формулы (I)



в которой основание¹ и основание² имеют определения, приведенные в п.1 формулы изобретения, и представляют собой модуляторы STING.

A1

201992209

201992209

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИНУКЛЕОТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

5

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым модифицированным циклическим динуклеотидным соединениям («CDN») формулы (I) и к их фармацевтически приемлемым солям, которые индуцируют выработку
10 цитокинов. Эти модифицированные CDN состоят из одной 3',5'-связанной блокированной нуклеиновой кислоты (LNA) и 2'-монофторированного 3',5'-связанного нуклеотида, оба из которых содержат пуриновое азотистое основание и фосфоротиоатный фрагмент. Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям и комбинациям, содержащим указанные
15 соединения, и к их применению в способах лечения заболеваний, связанных с или модулированных посредством STING (стимулятора генов интерферона). В частности, фармацевтические композиции в соответствии с изобретением пригодны для терапии воспаления, аллергических и аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний, рака и в качестве адъювантов для вакцин.

Предпосылки создания изобретения

Роль иммунной системы заключается в защите организма от болезнетворных организмов и злокачественных клеток. Тем не менее, вирусы и раковые клетки находят способы уклониться от иммунной системы. Таким образом, цель иммунотерапии состоит в том, чтобы инициировать
25 антигенспецифический иммунный ответ или повторно активировать ранее существовавший ответ в определенных типах клеток иммунной системы против патогенных возбудителей или раковых клеток.

Иммунная система состоит из нескольких специализированных линий, которые можно условно подразделить на две группы: врожденную и адаптивную
30 иммунную систему. Для успешной иммунной реакции, линии из обеих групп должны действовать согласованно. Основная роль врожденной иммунной системы заключается в создании быстрого иммунного ответа против болезнетворных организмов или злокачественных клеток, который, в отличие от адаптивной системы, не является антигенспецифическим и продолжительным. В

дополнение к прямому уничтожению патогенов или трансформированных клеток, врожденная иммунная система также активирует и впоследствии направляет адаптивную иммунную систему. Антигенпредставляющие клетки, такие как дендритные клетки, захватывают и представляют антигены в форме комплекса пептид-главный комплекс гистосовместимости (МНС) Т-клеткам в лимфоидных тканях. Это представление антигена вместе с секрецией определенных цитокинов приводит к активации и дифференцировке антигенспецифических эффекторных CD4 и CD8 Т-клеток. Выработка интерферона типа I (IFN) антигенпредставляющими клетками и другими типами клеток считается ключевым событием в активации Т-клеток, поскольку отсутствие IFN типа I приводило к снижению зависимого от Т-клеток иммунного ответа против вирусных инфекций или опухолевых клеток (Zitvogel et al, Nature Reviews Immunology 15, 405 - 414, 2015). С другой стороны, наличие сигнатуры IFN типа I во время лечения рака связано с повышенным количеством проникающих в опухоль Т-клеток и потенциально благоприятным клиническим исходом (Sistigu et al, Nature Medicine 20, 1301 – 1309, 2014).

Недавние исследования на мышах показали, что эффективная секреция IFN типа I в микроокружении опухоли и индукция зависимого от Т-клеток иммунного ответа против раковых клеток зависит от присутствия адаптерного белка *стимулятор генов интерферона* (STING, также известный как Tmem173, MPYS, MITA, ERIS) (Woo et al, Immunity 41, 5, 830 – 842, 2014; Corrales et al, Cell Reports 11, 1018 – 1030, 2015; Deng et al, Immunity 41, 5, 843 – 852, 2014). Важность присутствия IFN типа I была наглядно подтверждена тем фактом, что делеция STING приводила к снижению уровней IFN типа I в микроокружении опухоли и к снижению противоопухолевого эффекта в некоторых мышинных моделях опухолей. С другой стороны, специфическая активация STING приводила к улучшенному антигенспецифическому Т-клеточному иммунному ответу против раковых клеток.

STING принадлежит к семейству сенсоров нуклеиновых кислот и является адаптером для передачи сигналов цитозольных ДНК. В своем базальном состоянии STING существует в виде димера с его N-концевым доменом, закрепленным в ER, и C-концевым доменом, находящимся в цитозоле. Циклические динуклеотиды (CDN), генерируемые белком циклическая GMP-AMP-синтаза (cGAS), являются естественными лигандами STING (Ablasser et al,

Nature 498, 380 – 384, 2013). Связывание CDN со STING вызывает конформационные изменения, которые позволяют связывать и активировать TANK-связывающую киназу (TBK1) и регуляторный фактор интерферонов 3 (IRF3) и перемещать из ER в перинуклеарные эндосомы (Liu et al, Science 347, Issue 6227, 2630-1 – 2630-14, 2015). Фосфорилирование транскрипционного фактора IRF3 и NF- κ B посредством TBK1 приводит к экспрессии множества цитокинов, включая IFN типа I.

Учитывая важность IFN типа I при некоторых злокачественных новообразованиях, включая вирусные инфекции и терапию рака, терапевтический интерес представляют стратегии, которые обеспечивают специфическую активацию STING.

В WO 2014/093936 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания и два канонических 3',5' фосфодиэфирных или фосфоротиоатных фрагмента и индуцируют STING-зависимую выработку цитокинов.

В US 7,709,458 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания и два канонических 3',5' фосфодиэфирных фрагмента и могут быть использованы для ингибирования пролиферации раковых клеток или для усиления апоптоза раковых клеток, в частности симметричного бактериального CDN c-di-GMP.

В US 7,592,326 описаны иммуностимулирующие циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания и два канонических 3',5' фосфодиэфирных фрагмента, в частности симметричный бактериальный CDN c-di-GMP.

В WO 2016/096174 и WO 2016/145102 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания и два канонических 3',5' фосфодиэфирных или фосфоротиоатных фрагмента и индуцируют STING-зависимую выработку цитокинов.

У Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 5631–5634 описаны иммуностимулирующие моно- и бисфосфоротиоатные аналоги симметричного бактериального CDN c-di-GMP.

В WO 2014/189805 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания и по меньшей мере один

неканонический 2',5' фосфодиэфирный или фосфоротиаотный фрагмент и индуцируют STING-зависимую выработку цитокинов.

В WO 2015/185565 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания, один или два цикlopентана вместо тетрагидрофурановых колец рибозы и один неканонический 2',5' фосфодиэфирный фрагмент и модулируют STING.

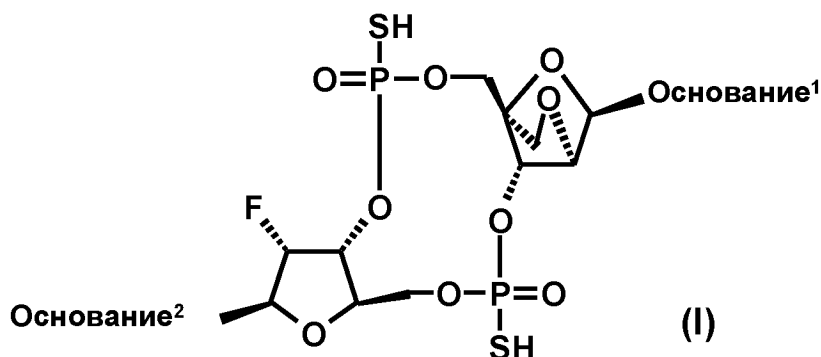
В WO 2016/120305 описаны циклические динуклеотидные соединения, которые содержат два пуриновых азотистых основания, один фрагмент рибозы, в котором 2'-ОН заменен на 2'-F и один неканонический 2',5' фосфодиэфирный фрагмент и модулируют STING.

В US 2014/0329889, WO 2014/099824, WO 2015/017652, Cell 154, 748–762 (2013) и Molecular Cell 51, 226–235 (2013) описан циклический динуклеотид 2'3'-сGAMP (циклический [G(2',5')pA(3',5')p]), который содержит два пуриновых азотистых основания, один канонический 3',5' и один неканонический 2',5' фосфодиэфирный фрагменты. Неканонически связанный 2'3'-сGAMP связывается со STING человека с более высокой аффинностью, чем канонически связанный 3'3'-сGAMP или симметричный бактериальный с-di-GMP и индуцирует выработку интерферона типа I.

Другие циклические динуклеотиды с 2',5'-2',5' или 2',5'-3',5' связностью раскрыты как агонисты STING в WO 2017/027645 и соответственно WO 2017/027646.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (I)



в которой

Основание¹ и Основание² представляют собой пуриновые азотистые основания, независимо выбранные из группы, включающей пурин, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин, связанные через их атомы азота N⁹,

их изоформы, таутомеры, стереоизомеры, метаболиты, пролекарства, сольваты, гидраты и соли.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей одно или большее количество соединений формулы (I), как определено выше или ниже, или их фармацевтически приемлемые соли, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей одно или большее количество соединений формулы (I), как определено выше или ниже, или их фармацевтически приемлемые соли, и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (I) или к его фармацевтически приемлемой соли для применения в качестве лекарственного средства.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли в качестве адъюванта для вакцины.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING, в особенности для лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака у нуждающегося в этом пациента.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению одного или большего количества указанных ингибиторов в изготовлении лекарственного средства для лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING, в особенности для лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака у нуждающегося в этом пациента.

К тому же, настоящее изобретение относится к соединению формулы (I), как определено выше или ниже, или к его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING, в особенности для лечения воспаления, 5 аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака у нуждающегося в этом пациента.

Другие объекты настоящего изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники непосредственно из приведенного выше и в дальнейшем описания, а также из примеров.

10 Термины и определения

Термины, конкретно не определенные в настоящей заявке, должны иметь значения, которые будут приданы им специалистом в данной области в свете раскрытия и контекста. Однако, как используют в описании, если не указано иное, нижеследующие термины имеют приведенное значение, и соблюдаются 15 следующие условные обозначения.

Термины «соединение(я) в соответствии с настоящим изобретением», «соединение(я) формулы (I)», «соединение(я) согласно изобретению» и тому подобное обозначают соединения формулы (I), предлагаемые в настоящем изобретении, включая их таутомеры, стереоизомеры и их смеси и их соли, в 20 частности их фармацевтически приемлемые соли, и сольваты и гидраты таких соединений, включая сольваты и гидраты таких таутомеров, стереоизомеров и их солей.

Если не указано конкретно, то во всем описании и прилагаемой формуле изобретения данная химическая формула или название должны охватывать 25 таутомеры и все стерео-, оптические и геометрические изомеры (например, энантиомеры, диастереомеры, E/Z изомеры и т.д.) и их рацематы, а также смеси в различных соотношениях отдельных энантиомеров, смесей диастереомеров или смесей любой из вышеуказанных форм, где существуют такие изомеры и энантиомеры, а также соли, включая их фармацевтически приемлемые соли и их 30 сольваты, такие как, например, гидраты, включая сольваты свободных соединений или сольваты соли соединения.

В случае, когда соединение в соответствии с настоящим изобретением изображено в форме химического названия и в виде формулы, в случае любого расхождения преимущественную силу имеет формула.

Звездочка может быть использована в подформулах для обозначения связи, которая связана с основной молекулой, как определено.

Используемый в настоящей заявке термин «по существу чистый» в отношении соединений общей формулы (I) относится к одному (Rp,Rp), (Rp,Sp), (Sp,Rp) или (Sp,Sp) диастереомеру, который является по меньшей мере на 75% чистым по отношению к другим возможным диастереомерам, принимая во внимание атомы фосфора. В предпочтительных вариантах осуществления по существу чистые соединения общей формулы (I) являются чистыми по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, и по меньшей мере на 99%.

Термин «защитная группа», используемый в настоящей заявке и если не указано иное, относится к химической функциональной группе, которая присоединена к атому кислорода, азота или фосфора для предотвращения дальнейшей реакции этого атома или для других целей. Специалистам в области органического синтеза известно широкое разнообразие защитных групп, и они описаны, например, в «Protective Groups in Organic Synthesis» у T.W. Greene and P.G.M. Wuts, третье издание, 1999.

Используемое в настоящей заявке выражение «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, веществам, композициям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения, пригодны к применению при контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другого нарушения, или осложнения, и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем получения его кислотных или основных солей. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ними, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные, аммониевые или органические соли кислотных остатков, таких как фосфодиэфирные или фосфоротиоатные фрагменты; и тому подобное.

Используемые в настоящей заявке термины «модулированный» или «модулирующий» или «модулировать (модулирует)», если не указано иное, относятся к активации пути STING одним или несколькими соединениями в

соответствии с настоящим изобретением, в данном случае представляющими собой агонисты STING.

Термины «лечение» и «лечить» охватывают как предупредительное, то есть профилактическое, так и терапевтическое, т.е. лечебное и/или паллиативное лечение.

Терапевтическое лечение относится к лечению пациентов, у которых уже развилось одно или несколько из указанных состояний в явной, острой или хронической форме. Терапевтическое лечение может быть симптоматическим лечением для облегчения симптомов конкретного показания или причинного лечения для того, чтобы полностью или частично изменить условия показания или для остановки или замедления прогрессирования заболевания. К тому же, терапевтическое лечение охватывает лечение в течение определенного периода времени, а также для длительной терапии.

Превентивное лечение («предупреждение», «профилактическое лечение») относится к лечению пациентов с риском развития одного или нескольких из указанных состояний до клинического начала заболевания с целью снижения указанного риска.

Термины «лечение» и «лечить» включают введение одного или нескольких активных соединений с целью предотвращения или задержки появления симптомов или осложнений, а также с целью предотвращения или задержки развития заболевания, состояния или расстройства и/или чтобы устранить или контролировать заболевание, состояние или расстройство, а также для облегчения симптомов или осложнений, связанных с заболеванием, состоянием или расстройством.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество соединения в соответствии с настоящим изобретением, которое (I) лечит или предотвращает конкретное заболевание или состояние, (II) смягчает, ослабляет или устраняет один или несколько симптомов конкретного заболевания или состояния или (III) предотвращает или задерживает появление одного или нескольких симптомов конкретного заболевания или состояния, описанного в настоящей заявке.

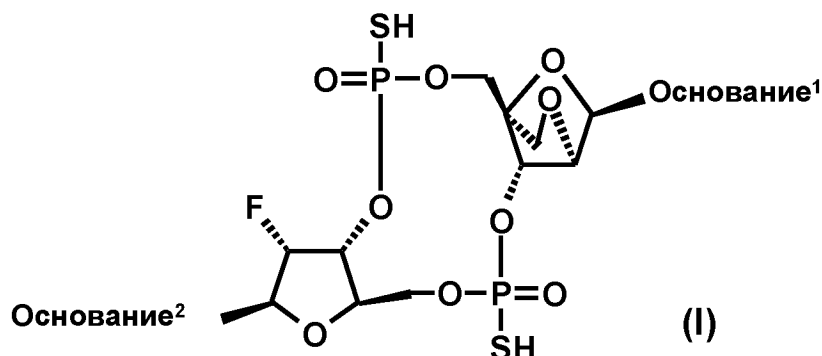
Если настоящее изобретение относится к пациентам, нуждающимся в лечении, то в первую очередь оно относится к лечению млекопитающих, в частности людей.

Подробное описание изобретения

Соединения изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения, обнаружено, что модифицированные CDN формулы (I)

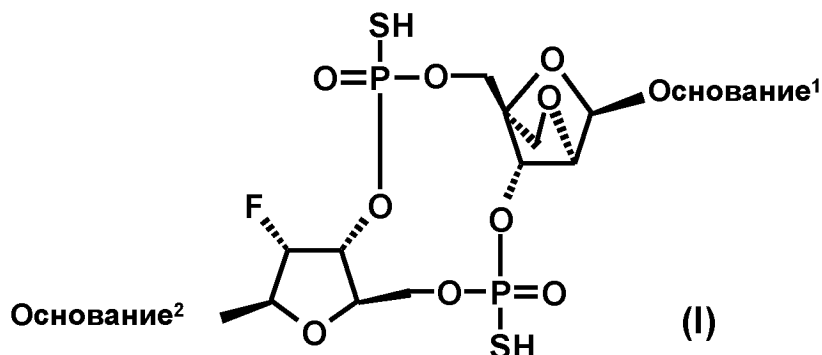
5



в которой Основание¹ и Основание² имеют определения, приведенные выше и в дальнейшем, проявляют благоприятную аффинность связывания со STING человека и благоприятную активность в клетках, несущих различные аллели STING человека, которые могут позволить достичь фармакологической эффективности при низких дозах.

Поэтому, соединения формулы (I), как определено выше или ниже, или их фармацевтически приемлемые соли, как ожидается, будут полезны при лечении заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, соединение формулы (I)



в которой Основание¹ и Основание² имеют определения, приведенные выше или в дальнейшем, обеспечивается также в виде изоформ, таутомеров,

стереоизомеров, метаболитов, стереоизомеров, метаболитов, пролекарств, сольватов, гидратов и их солей, в особенности, их физиологически приемлемых солей с неорганическими или органическими основаниями.

Некоторые предпочтительные значения заместителей Основание¹ и
5 Основание² будут приведены в дальнейшем. Любое и каждое из этих определений может сочетаться друг с другом.

В соответствии с одним вариантом осуществления Основание¹ выбирают из группы, включающей в себя пурин, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин, связанные через их атомы азота N⁹.

10 В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ выбирают из группы, включающей в себя аденин и гуанин, связанные через их атомы азота N⁹.

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ представляет собой пурин, связанный через его атом азота N⁹.

15 В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ представляет собой аденин, связанные через их атом азота N⁹.

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ представляет собой гуанин, связанный через его атом азота N⁹.

20 В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ представляет собой ксантин, связанный через его атом азота N⁹.

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание¹ представляет собой гипоксантин, связанный через его атом азота N⁹.

25 В соответствии с одним вариантом осуществления, Основание² выбирают из группы, включающей в себя пурин, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин, связанные через их атомы азота N⁹,

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² выбирают из группы, включающей в себя аденин, гуанин и гипоксантин, связанные через их атомы азота N⁹.

30 В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² представляет собой пурин, связанный через его атом азота N⁹.

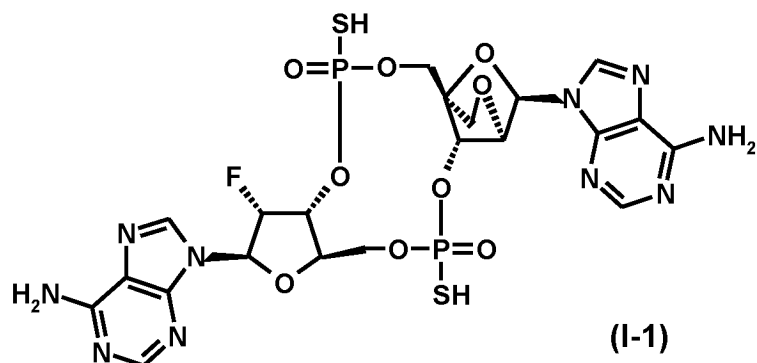
В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² представляет собой аденин, связанный через его атом азота N⁹.

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² представляет собой гуанин, связанный через его атом азота N⁹.

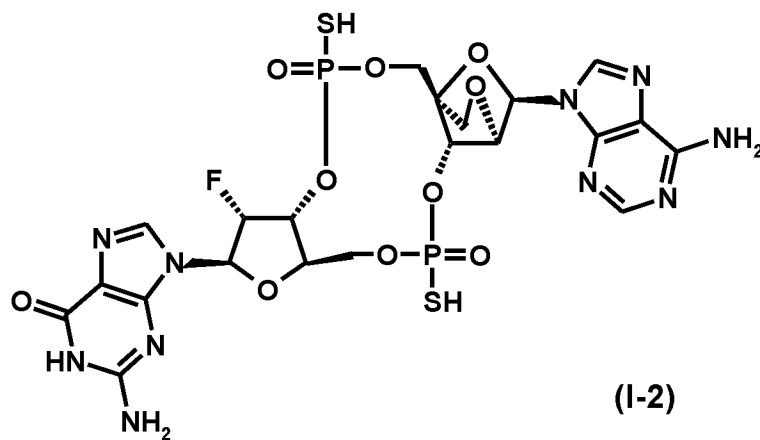
В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² представляет собой ксантин, связанный через его атом азота N⁹.

В соответствии с другим вариантом осуществления, Основание² представляет собой гипоксантин, связанный через его атом азота N⁹.

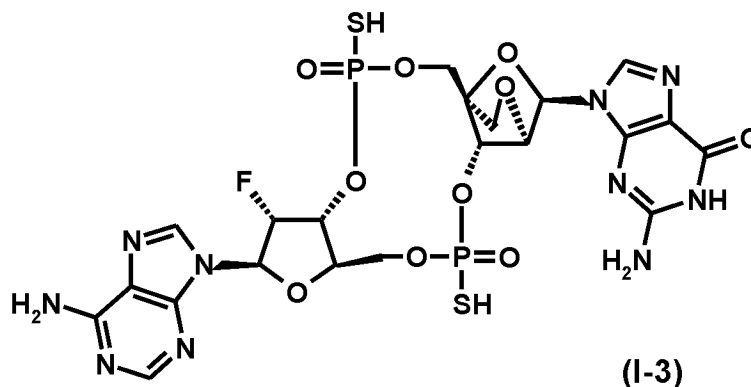
5 В соответствии с другим вариантом осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение (I-1)



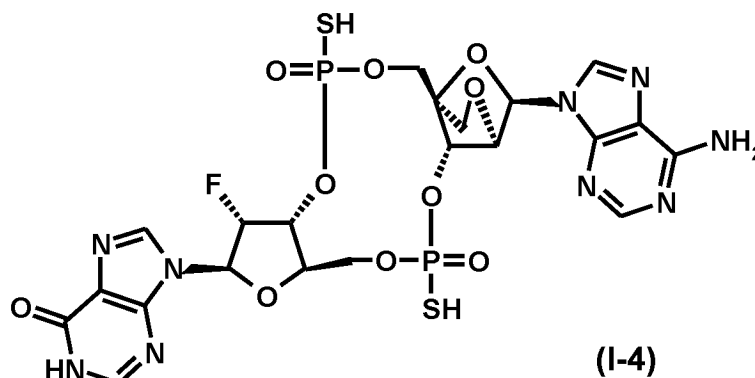
10 В соответствии с другим вариантом осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение (I-2)



В соответствии с другим вариантом осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение (I-3)



В соответствии с другим вариантом осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение (I-4)



Соединения в соответствии с настоящим изобретением содержат хиральные атомы фосфора с конфигурацией либо Rp, либо Sp. Все стереоизомеры соединений формулы (I), (I-1), (I-2), (I-3) и (I-4), либо в по существу чистой форме, либо в виде их смесей, охватываются объектом изобретения. Предпочтительными являются соединения общей формулы (I), (I-1), (I-2), (I-3), и (I-4) в виде по существу чистых (Rp,Rp), (Rp,Sp), (Sp,Rp) или (Sp,Sp) стереоизомеров.

Получение

Соединения в соответствии с изобретением и их промежуточные соединения могут быть получены с использованием способов синтеза, которые известны специалисту в данной области и описаны в литературных источниках по органическому синтезу. Предпочтительно соединения получают аналогично способам получения, более подробно описанным ниже, в частности, как описано в экспериментальном разделе. В некоторых случаях последовательность,

принятая при проведении схем реакций, может варьироваться. Также могут быть использованы варианты этих реакций, которые известны специалисту в данной области, но подробно не описаны в настоящей заявке. Общие способы получения соединений в соответствии с изобретением станут понятны специалисту при изучении нижеследующей методики. Исходные соединения являются коммерчески доступными или могут быть получены способами, которые описаны в литературных источниках или в настоящей заявке, или могут быть получены аналогичным или подобным способом. Перед проведением реакции любые соответствующие функциональные группы в соединениях могут быть защищены с использованием обычных защитных групп. Эти защитные группы могут быть снова отщеплены на подходящей стадии в последовательности реакции с использованием способов, известных специалисту в данной области.

Раскрытые в настоящей заявке CDN могут быть получены как подробно описано ниже, или другими способами, известными специалистам в данной области. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что эти схемы никоим образом не являются ограничивающими и что могут быть произведены изменения некоторых частных вариантов без отклонения от сущности настоящего изобретения.

CDN могут быть получены способами, описанными в Chem. Rev. 113, 7354–7401 (2013), Org. Lett., 12, 3269–3271 (2010), Tetrahedron 49, 1115–1132 (1993), WO 2017/0247645, WO 2017/027646, WO 2014/189805, WO 2016/096174, WO 2015/185565, WO 2016/145102 или WO 2016/120305 и в процитированных там ссылках.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, соединения формулы (I) и их соли могут быть получены с помощью описанной ниже методики.

Специалистам в данной области будет понятно, что фосфоротиоатные фрагменты в формуле (I) могут существовать в R-конфигурации (R_P) или S-конфигурации (S_P). Описанная ниже методика может дать до четырех диастереомеров в отношении атомов фосфора, которые могут быть разделены методами, известными специалисту в данной области, например, хроматографией и/или фракционной кристаллизацией, например, ВЭЖХ с пригодными системами растворителей и колонками на разных стадиях синтеза.

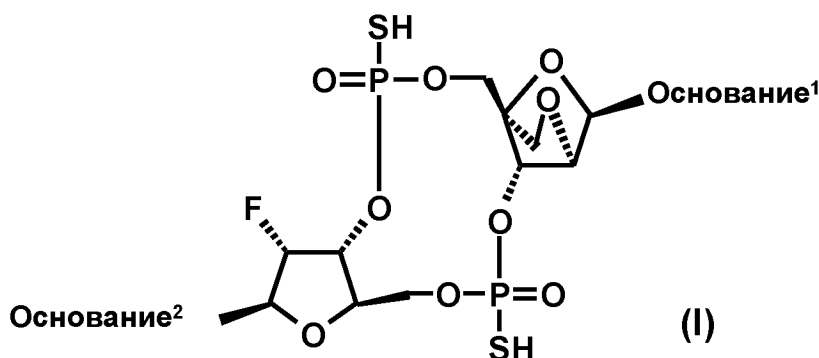
В некоторых случаях, например, когда одна стадия сульфуризации протекает диастереоселективно, описанная ниже методика предпочтительно может давать только два диастереомера, которые могут быть разделены хроматографическими методами, известными специалисту в данной области на разных стадиях синтеза.

5 Как указано выше, соединения формулы (I) могут быть превращены в соли с помощью способов, известных специалисту в данной области, в особенности для фармацевтического применения в фармацевтически приемлемые соли.

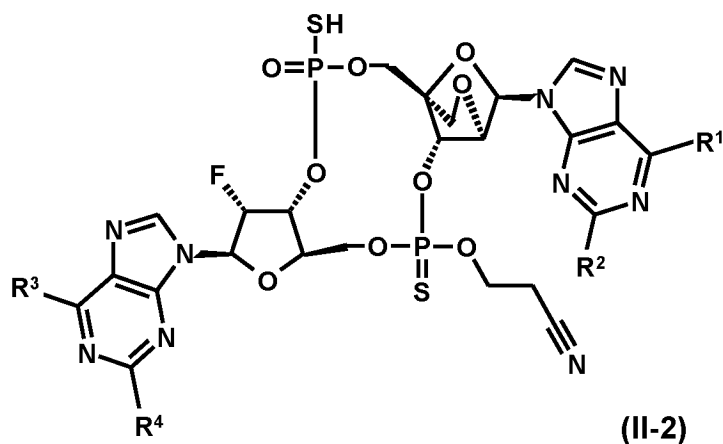
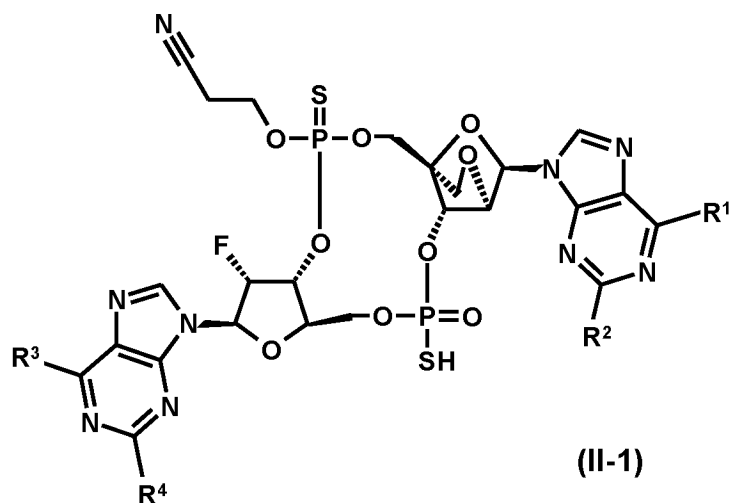
10 Соединения в соответствии с изобретением преимущественно можно также получать, используя способы, описанные в нижеследующих примерах, которые также могут быть объединены для этой цели со способами, известными специалисту в данной области техники из литературных источников.

Под заместителями, явно не указанными в следующих способах получения, подразумевают, что они охватывают определения, упомянутые выше в разделе «Сущность изобретения».

15 Соединение формулы (I)



может быть получено путем снятия защиты с соединения формулы (II-1) или (II-2)



в которой или

R^1 означает NH, несущий подходящую защитную группу, такую как бензоил, а R^2 означает H («защищенный аденин») или

R^1 означает OH и R^2 означает NH, несущий подходящую защитную группу, такую как *изо*-бутирил или *N,N*-диметилформаидинил («защищенный гуанин») или

R^1 и R^2 оба означают OH («ксантин») или

R^1 означает OH и R^2 означает H («гипоксантин») или

R^1 и R^2 оба означают H («пурин»); и

в которой или

R^3 означает NH, несущий подходящую защитную группу, такую как бензоил, а R^4 означает H («защищенный аденин») или

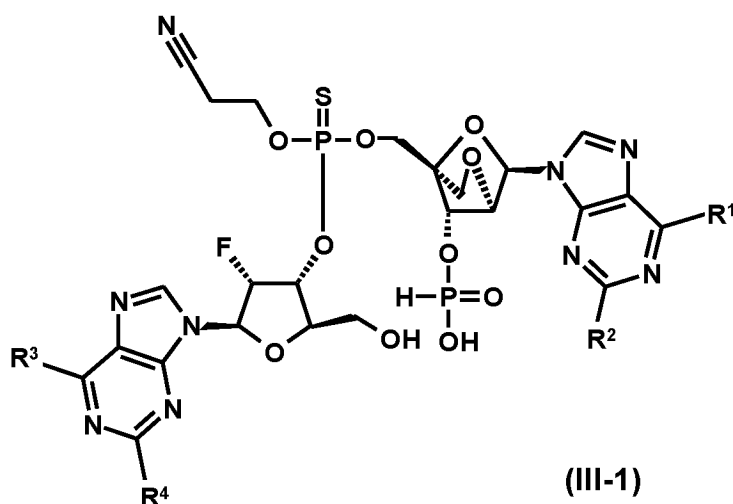
R^3 означает OH и R^4 означает NH, несущий подходящую защитную группу, такую как *изо*-бутирил или *N,N*-диметилформаидинил («защищенный гуанин») или

R^3 и R^4 оба означают OH («ксантин») или

R^3 означает OH, а R^4 означает H (“гипоксантин”) или R^3 и R^4 оба означают H (“пурин”).

Например, соединение формулы (II-1) или (II-2) растворяют в пригодной смеси, например, метиламина или водного раствора аммиака в метаноле или этаноле, и перемешивают при приемлемой температуре, например, 20-60°C, в течение подходящего периода времени, например, 1-24 часов.

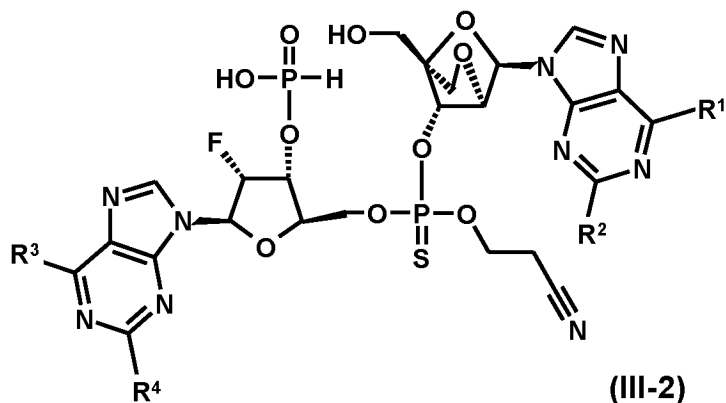
Соединение формулы (II-1) может быть получено циклизацией и последующей сульфуризацией соединения формулы (III-1):



в которой R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют приведенные выше определения.

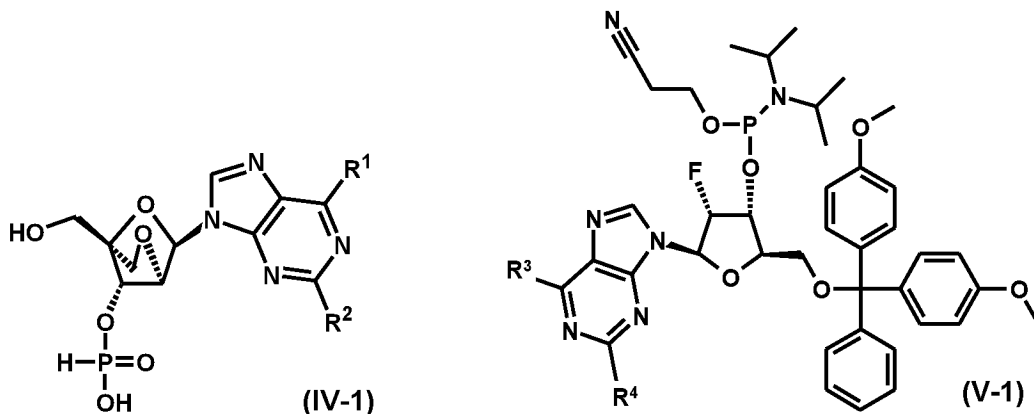
Например, соединение формулы (III-1) растворяют в пригодном растворителе, например, пиридине или смеси пиридина и дихлорметана, и обрабатывают пригодным реагентом сочетания, например, 2-хлор-5,5-диметил-1,3,2-диоксафосфоринан 2-оксид (DMOCP), дифенилхлорфосфат, пивалоилхлорид или адамантоилхлорид, и перемешивают при подходящей температуре, например, от -50°C до 20°C, в течение подходящего периода времени, например, 0,1 - 2 часа. Реакцию циклизации гасят путем обработки подходящим реагентом сульфуризации, например, таким как 3H-1,2-бензодитиол-3-он или элементарная сера, и перемешивают при подходящей температуре, например, от -50°C до 20°C, в течение подходящего периода времени, например, 0,1 - 2 часа.

Аналогичным образом, соединение формулы (II-2) может быть получено циклизацией и последующей сульфуризацией соединения формулы (III-2):



в которой R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют приведенные выше определения.

- 5 Соединение формулы (III-1) может быть получено путем сочетания соединения формулы (IV-1) с соединением формулы (V-1):

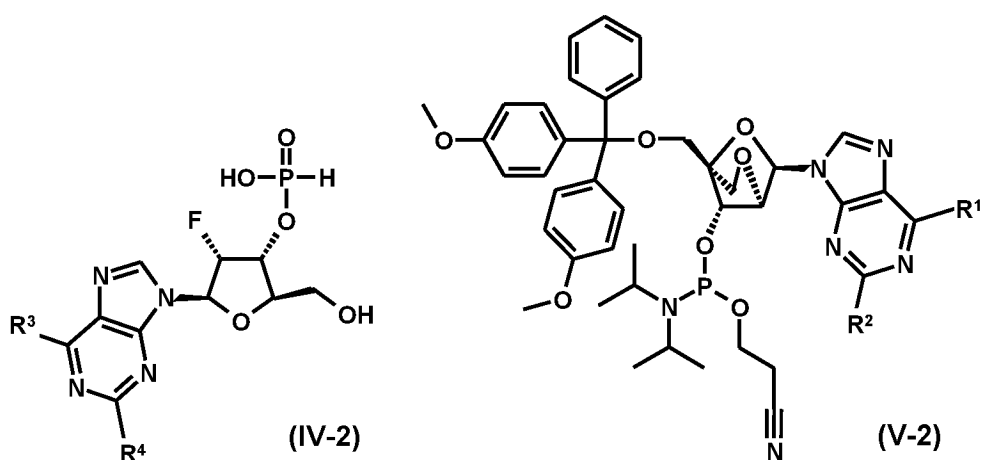


в которой R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют приведенные выше определения.

- 10 Например, соединение формулы (V-1) растворяют в пригодном растворителе, например, ацетонитриле и обрабатывают раствором соединения формулы (IV-1), растворенного в пригодном растворителе, например, ацетонитриле, по выбору в присутствии пригодного реагента сочетания, например, тетразола, Activator 42® (раствор активатора, содержащий 5-(3,5-
- 15 бис(трифторметил)фенил)-1H-тетразол в ацетонитриле), дихлорацетата пиридиния или трифторацетата пиридиния (или смеси реагентов сочетания), и перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 0,1 - 2 часов. Реакцию сочетания гасят
- 20 путем обработки пригодным реагентом сульфуризации, например, 3-((N,N-диметиламинометилен)амино)-3H-1,2,4-дитиазол-3-тион (DDTT) или

фенилацетил дисульфид (PADS) или 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксид (реагент Бокажа), и перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 0,1-2 часа. После выпаривания растворителя, остаток растворяют в пригодном растворителе, например, смеси дихлорметана и воды, и обрабатывают пригодным реагентом, например, дихлоруксусной кислотой, и перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 0,1 - 1 час.

Соединение формулы (III-2) может быть получено аналогичным образом путем сочетания соединения формулы (IV-2) с соединением формулы (V-2):



в которой R¹, R², R³ и R⁴ имеют приведенные выше определения.

Соединение формулы (IV-1) может быть получено путем реакции соединения формулы (V-2), как определено выше.

Например, коммерчески доступное соединение формулы (V-2) растворяют в пригодной смеси, например, ацетонитриле, содержащем воду, и обрабатывают трифторацетатом пиридиния, и перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 1-30 минут. Затем добавляют *трет*-бутиламин, и смесь перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 0,1 - 1 час. Продукт выделяют выпариванием растворителя, затем растворяют в пригодном растворителе, например, дихлорметане, содержащем воду и обрабатывают дихлоруксусной кислотой и перемешивают при подходящей температуре, например, 0 - 20°C, в течение приемлемого периода времени, например, 0,1 - 1 час.

Соединения общей формулы I или их синтетические промежуточные соединения могут быть разделены на их диастереомеры используя преимущества их различных физико-химических свойств с применением, по сути, известных способов, например, хроматографии и/или фракционной кристаллизации.

5 Соединения в соответствии с изобретением можно также выгодно получать, используя способы, описанные в нижеследующих примерах, которые также могут быть объединены для этой цели со способами, известными специалисту в данной области техники из литературных источников.

10 Фармацевтически приемлемые соли в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит кислотный фрагмент, обычными химическими способами. Как правило, такие соли могут быть получены путем взаимодействия форм свободной кислоты этих соединений с достаточным количеством соответствующего основания в воде или в органическом разбавителе, таком как
15 эфир, этилацетат, этанол, *n*-пропанол, изопропанол, ацетон или ацетонитрил, или их смесь. В качестве альтернативы, хроматография с обращенной фазой соединений по изобретению (в форме свободной кислоты или соли) с использованием «летучих буферов», таких как водные растворы ацетата триэтиламмония, формиата триэтиламмония, ацетата аммония или
20 гидрокарбоната аммония, дает соединения в соответствии с изобретением в виде соответствующей соли триэтиламмония или аммония после лиофилизации/сублимационной сушки. Альтернативно, соли могут быть получены ионным обменом, например, путем обработки водных растворов соединений в соответствии с изобретением (в форме свободной кислоты или
25 соли) с катионообменником.

Фармакологическая активность

Соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют благоприятную аффинность связывания со STING человека. Аффинность связывания может быть определена, например, с помощью анализа конкурентного связывания на основе сцинтилляционного анализа сближения
30 (SPA), как описано в Nat. Chem. Biol. 10, 1043–1048 (2014). Альтернативно, аффинность связывания может быть определена, например, с помощью изотермической титрационной калориметрии (ITC), как описано в Molecular Cell 51, 226–235 (2013). Альтернативно, аффинность связывания может быть

определена, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в WO 2016/145102. В ином случае, аффинность связывания может быть определена, например, с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), как описано ниже.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют благоприятную клеточную активность. Индукцию цитокинов *in vitro* можно измерить в репортерных клеточных линиях, например, в клетках THP1, как описано ниже. STING человека существует по меньшей мере в пяти известных вариантах (WT, HAQ, REF / 232H, AQ, Q / 293Q). Чтобы проверить активность различных CDN на вариантах STING человека, клетки THP1-STING KO можно стабильно трансдуцировать векторами, кодирующими разные варианты STING. Кроме того, индукция цитокинов *in vitro* может быть измерена в первичных PBMC человека или дендритных клетках человека.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют благоприятную стабильность в клеточных анализах *in vitro*, например, с клетками THP1, клетками Calu-3 или гепатоцитами человека. Кроме того, соединения в соответствии с настоящим изобретением обладают благоприятными фармакокинетическими свойствами (ФК). ФК свойства могут быть определены у видов доклинических животных, например, у мышей, крыс, хомяков, собак, морских свинок, карликовых свиней, яванских макаков, макаков резус. ФК свойства соединения могут быть описаны, например, следующими параметрами: среднее время удержания (MRT), период полувыведения ($t_{1/2}$, то есть время, необходимое для того, чтобы концентрация лекарственного средства достигла половины его исходного значения), объем распределения (V_D , то есть кажущийся объем, в котором распределено лекарственное средство), площадь под кривой (AUC, то есть интеграл кривой концентрация-время после однократного приема), клиренс (CL, то есть объем плазмы, очищенной от лекарственного средства за единицу времени), как описано в E. Kerns & L. Di (Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization, Elsevier, 1^е изд., 2008). Кроме того, соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют благоприятную фармакологическую активность *in vivo*, например, на мышинных моделях опухолей MC38, B16, 4T1, Colon26, EMT6 после внутриопухолевого применения.

Благоприятная аффинность связывания со STING человека в сочетании с благоприятной клеточной активностью и/или благоприятными ФК свойствами может обеспечить более низкие дозы для фармакологической эффективности. Более низкие дозы обладают преимуществами более низкой «лекарственной нагрузки» или «лекарственного отягощения» (исходным лекарственным средством и его метаболитами) для пациента, вызывая потенциально меньшие побочные эффекты, и более низкие производственные затраты на лекарственный продукт. Подобная сильная активность против вариантов STING человека является преимущественной, поскольку она максимизирует шансы индуцировать желаемый фармакологический ответ у пациентов с однонуклеотидным полиморфизмом, когда вводят фиксированную дозу.

Связывание соединений в соответствии с изобретением со STING человека может быть продемонстрировано с использованием следующего анализа:

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (ДСФ)

Материалы:

Тонкостенные 384-луночные планшеты Hard-Shell[®]PCR (№ по каталогу HSP3805R, BIO-RAD)

Microseal[®] В' клейкая герметизирующая пленка для планшетов ПЦР ((№ по каталогу MSB-1001, BIO-RAD)

SYPRO оранжевый раствор в DMSO (SIGMA кат. № S5692-500UL), концентрация «5000х»

Измерительные приборы: считывающее устройство: CFX384 Real-Time Система (Bio-Rad)

Робот для пипетирования: HamiltonStarlet

Буфер для анализа: 20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.5

Целевой белок: STING человека (hSTING, остатки 155-341, последовательность дикого типа с N-концевой His8-меткой и TEV-сайтом расщепления, MM: 23601,5 Да)

Белковый исходный раствор: с = 309 мкМ исходный раствор в буфере для анализа

Конечные аналитические концентрации исследуемых соединений: 100 мкМ, 3 мкМ целевого белка, «5х» SYPR Orange

Процедура анализа:

1) Исходные растворы соединений и их разведения готовили в буфере для анализа

2) 5 мкл исходного раствора флуоресцентного красителя (5000x SYPRO Orange) смешивали с 50 мкл целевого белка (309 мкМ) и 945 мкл буфера.

3) 2 мкл этой смеси белка и красителя (25x SYPRO Orange и 15 мкМ белка) добавляли к 8 мкл раствора соединения. Конечный объем составлял 10 мкл.

4) Некоторые позиции лунок использовали в качестве отрицательного контроля.

5) Планшеты готовили для двойного измерения и центрифугировали в течение 2 минут при 1000 g.

6) При измерении было использовано 160 циклов при 0,5 °C (диапазон температур 15 с/цикл, от 15 °C до 95 °C).

Анализ данных: кривые диссоциации обрабатывали в Bio-Rad CFX Manager. Тип пика был установлен на «отрицательный». В случае Примеров 1.1, 2.1, 3.1 и 4.1, по меньшей мере два измерения T_m были усреднены. Изменения в T_m («тепловой сдвиг») представлены в таблице 1.

Таблица 1: связывание hSTING по данным дифференциальной сканирующей флуориметрии

Пример	T _m сдвиг hSTING [°C]
1.1	27.6
1.2	21.0
2.1	30.3
2.2	21.8
3.1	30.7
3.2	22.4
3.3	21.6
3.4	10.9
4.1	30.0
4.2	21.4
Пример 5 Соединение 23 в WO 2016/145102	21.1

Неожиданно было обнаружено, что соединения в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют значительно улучшенное связывание по сравнению с аналогами, где фрагмент LNA заменен фрагментом рибозы, например, Примеры LNA 1.1, 2.1, 3.1 и 4.1 демонстрируют значительно большие тепловые сдвиги, то есть улучшенное связывание, по сравнению с рибозой,

Пример 5/Соединение 23 (“3’3’-RR-(2’F-G)(A)”) в заявке WO 2016/145102. Улучшенное связывание соединений согласно настоящему изобретению в вышеупомянутом анализе дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ) также было подтверждено в анализе поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Клеточная активность соединений в соответствии с изобретением может быть продемонстрирована с использованием следующего анализа THP1 *in vitro*:

ИНДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ IN VITRO

Индукцирующая цитокины активность соединений в соответствии с настоящим изобретением была продемонстрирована с использованием репортерной клеточной линии THP1.

Активация белка STING, экспрессируемого в клетках THP1, приводит к увеличению продукции интерферона. Благодаря стабильной интеграции репортерной конструкции SEAP (секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы), индуцируемой регуляторным фактором интерферона (IRF) можно отслеживать функциональный путь передачи сигналов интерферона. С помощью колориметрического ферментного анализа Invivogen QUANTI-Blue™ и пригодного считывающего устройства оптической плотности (ОП) можно обнаружить и количественно определить активность SEAP. Этот метод может быть использован для характеристики фармакологической модификации белка STING.

Измерения активности SEAP проводили в клетках THP1-Blue ISG, стабильно экспрессирующих белок STING человека и IRF-индуцируемую репортерную конструкцию SEAP. Клетки культивировали для размножения в среде RPMI1640 с 10% фетальной телячьей сывороткой, 50 мкг/мл пенициллин-стрептомицина, 100 мкг/мл зеоцина, и 100 мкг/мл нормоцина в инкубаторе при 37 °C, 95% влажности и 5% CO₂. Готовые к анализу клетки хранили в виде замороженных исходных растворов.

При подготовке к анализу клетки оттаивали в среде, не содержащей зеоцин/нормоцин, и распределяли в планшеты для анализа с плотностью 15000 клеток/15 мкл на лунку. Соединения получали путем серийного 8- или 16-точечного разведения в 50% водном ДМСО и стадии конечного разведения в среде для обеспечения в анализе конечной концентрации ДМСО 0,5%. 5 мкл

разбавленных соединений плюс 5 мкл среды добавляли в планшеты с последующей 24-часовой инкубацией при 37 °C.

В день анализа 75 мкл на лунку реагента Quanti-Blue добавляли во все лунки планшета, и планшет инкубировали в течение еще 30 минут при 37 °C. ОП измеряли при 620 нм на считывающем устройстве EnVision (PerkinElmer).

Значения EC₅₀ и коэффициенты Хилла были получены из 8- или 16-точечных нелинейных подгонок кривой по четырем параметрам с использованием программного обеспечения Megalab (Boehringer Ingelheim), с применением ОП при 620 нм. См. таблицу 2.

Таблица 2: Клеточная активность в клеточном анализе THP1-Blue ISG

Пример	EC ₅₀ [мкМ]
1.1	0.11
1.2	0.06
2.1	0.14
2.2	0.05
3.1	0.15
3.2	0.07
3.3	0.13
3.4	2.0
4.1	0.17
4.2	0.11

В гене STING человека было идентифицировано несколько однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут влиять на ответную реакцию на циклические динуклеотиды. Для определения активности соединений в соответствии с изобретением были получены линии репортерных клеток THP1-Blue ISG, экспрессирующие различные варианты STING человека. Для этого сначала удаляли эндогенный STING человека с использованием системы CRISPR/CAS9: клетки THP1-Blue ISG подвергали электропорации с помощью плазмид ALL-IN-ONE CRISPR, нацеленных на ген STING (приобретенных у Sigma, кодирующих gRNA и GFP в качестве репортерного гена для успешной трансдукции). GFP-положительные клетки затем сортировали через 24 часа после трансфекции и размножали. После этого клетки диспергировали в полутвердой среде метоцела, чтобы сделать возможным выделение клонов из одной клетки. Затем клоны подвергали скринингу на чувствительность к cGAMP с использованием анализа репортерного гена Quanti-blue. Нечувствительные

клоны впоследствии были проанализированы на предмет потери STING с помощью вестерн-блоттинга и секвенирования локуса STING.

Соответственно, для сверхэкспрессии вариантов STING человека, подтвержденный клон THP1-Blue ISG hSTING KO трансдуцировали индивидуальными ретровирусными плазмидами (MSCV-ires-GFP-Blasti), кодирующими аллельные варианты hSTING (WT, HAQ, R232H, AQ и R293Q). Трансдуцированные клетки сортировали по различным уровням флуоресценции GFP, а экспрессию аллеля STING анализировали вестерн-блоттингом. Для характеристики соединений были отобраны и использованы популяции, экспрессирующие эктопический белок STING (WT, HAQ, R232H, AQ и R293Q) в сопоставимых уровнях с уровнями эндогенного STING из родительских немодифицированных клеточных линий THP1-Blue ISG. Неожиданно было обнаружено, что соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют очень сильную клеточную активность во всех пяти вышеупомянутых вариантных клеточных линиях, например, Примеры 2.1, 3.1 и 4.1 демонстрируют значения ≤ 1 мкМ в WT, HAQ, R232H, AQ и R293Q вариантной клеточной линии, соответственно, что указывает на отсутствие выраженных вариантных различий/селективности. Наблюдаемая клеточная активность зависит от STING, так как в линии клеток THP1, где человеческий STING был удален, никакой активности не наблюдали.

Клеточную стабильность соединений в соответствии с изобретением измеряли следующим образом: соединение растворяли в среде для культивирования клеток (MEM с добавлением 10% FCS, 1% заменимых аминокислот и 1% пирувата) до конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали с линией эпителиальных клеток легких человека Calu-3 (60000 клеток/лунку в 24-луночном планшете) в течение до 24 ч. Образцы супернатантов клеточных культур отбирали через 1, 6, 24 ч. и количественно определяли с помощью ЖХ-МС/МС.

Способы лечения

В другом аспекте настоящего изобретения, установлено, что соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли могут быть применимы для лечения заболеваний или состояний, в которых модуляция STING имеет терапевтическую пользу. Кроме того, благодаря их активности соединения настоящего изобретения пригодны в качестве адъювантов для вакцин.

Заболевания и состояния, которые связаны с или модулируются посредством STING, включают, но не ограничены этим, воспаление, аллергические или аутоиммунные заболевания, например, аллергический ринит или астма, инфекционные заболевания или рак.

5 Аутоиммунные заболевания включают, но не ограничиваются этим, системную красную волчанку, псориаз, инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), дерматомиозит и синдром Шегрена (SS).

10 Воспаление представляет собой группу сосудистых, клеточных и неврологических ответных реакций на повреждение. Воспаление можно охарактеризовать как движение воспалительных клеток, таких как моноциты, нейтрофилы и гранулоциты, в ткани. Обычно оно связано со снижением барьерной функции эндотелия и отека в тканях. Воспаление можно классифицировать как острое или хроническое. Острое воспаление является первоначальной реакцией организма на вредные раздражители и достигается за
15 счет увеличения движения плазмы и лейкоцитов из крови в поврежденные ткани. Каскад биохимических событий распространяется и вызывает воспалительную ответную реакцию, вовлекая местную сосудистую систему, иммунную систему и различные клетки в пределах поврежденной ткани. Длительное воспаление, известное как хроническое воспаление, приводит к
20 прогрессивному сдвигу в типе клеток, которые присутствуют в месте воспаления, и характеризуется одновременным разрушением и заживлением ткани от воспалительного процесса.

Когда это происходит как часть иммунного ответа на инфекцию или как острый ответ на повреждение, то воспаление может быть целебным и обычно
25 самоограничивающимся. Тем не менее, воспаление может быть вредным при различных условиях. Это включает в себя возникновение чрезмерного воспаления в ответ на инфекционные агенты, которые могут привести к значительному повреждению органов и смерти (например, при сепсисе). Кроме того, хроническое воспаление, как правило, вредно и является причиной многих
30 хронических заболеваний, вызывающих серьезные и необратимые повреждения тканей. В таких условиях иммунный ответ часто направлен против собственных тканей (аутоиммунитет), хотя хронические ответы на инородные тела также могут привести к неспецифическому повреждению собственных тканей. Следовательно, цель противовоспалительной терапии состоит в том, чтобы

уменьшить это воспаление, подавить аутоиммунитет, когда он присутствует, и дать возможность прогрессировать физиологическому процессу или заживлению и восстановлению ткани.

Соединения в соответствии с изобретением могут быть использованы для
5 лечения воспаления любой ткани и органов тела, в том числе воспаления опорно-двигательного аппарата, сосудистого воспаления, воспаления нервов, воспаления системы органов пищеварения, глазного воспаления, воспаления репродуктивной системы, а также других воспалений, примеры которых приведены ниже.

10 Воспаление опорно-двигательного аппарата относится к любому воспалительному состоянию опорно-двигательной системы, в частности, тех состояний, которые поражают скелетные суставы, в том числе суставы кисти руки, запястья, локтя, плеча, челюсти, позвоночника, шеи, бедра, колена, лодыжки и стопы, и состояний, которые поражают ткани, соединяющие мышцы
15 и кости, такие как сухожилия. Примеры мышечно-скелетного воспаления, которое можно лечить соединениями в соответствии с изобретением включают артрит (включая, например, остеоартрит, ревматоидный артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, острый и хронический инфекционный артрит, артрит, связанный с подагрой и псевдоподагрой, и юношеский
20 идиопатический артрит), тендинит, синовит, теносиновит, бурсит, фиброзит (фибромиалгия), эпикондилит, миозит и остеит (включая, например, болезнь Педжета, остит лобковой кости и фиброзную остеодистрофию). Глазное воспаление относится к воспалению любой структуры глаза, включая веки. Примеры воспаления глаз, которые можно лечить с помощью соединений в
25 соответствии с изобретением включают блефарит, блефарохалазис, конъюнктивит, дакриoadенит, кератит, сухой кератоконъюнктивит (синдром сухого глаза), склерит, трихиаз и увеит. Примеры воспаления нервной системы, которое можно лечить соединениями в соответствии с изобретением включают энцефалит, синдром Гийена-Барре, менингит, нейромиотонию, нарколепсию,
30 рассеянный склероз, миелит и шизофрению.

Примеры воспаления сосудистой или лимфатической системы, которые можно лечить соединениями в соответствии с изобретением, включают атеросклероз, артрит, флебит, васкулит и лимфангит.

Примеры воспалительных состояний пищеварительной системы, которые можно лечить с помощью соединений в соответствии с изобретением, включают холангит, холецистит, энтерит, энтероколит, гастрит, гастроэнтерит, воспалительное заболевание кишечника (такое как болезнь Крона и язвенный колит), илеит и проктит.

Примеры воспалительных состояний репродуктивной системы, которые можно лечить с помощью соединений в соответствии с изобретением, включают цервицит, хориоамнионит, эндометрит, эпидидимит, омфалит, оофорит, орхит, сальпингит, трубно-яичниковый абсцесс, уретрит, вагинит, вульвит и вульводинию.

Средства могут быть использованы для лечения аутоиммунных состояний, имеющих воспалительный компонент. Такие состояния включают в себя острую диссеминированную общую алопецию, болезнь Бехчета, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости, вегето-сосудистую дистонию, энцефаломиелит, анкилозирующий спондилит, апластическую анемию, гнойный гидраденит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный оофорит, целиакию, болезнь Крона, сахарный диабет 1 типа, гигантоклеточный артериит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, пурпуру Шенлейна-Геноха, болезнь Кавасаки, красную волчанку, микроскопический колит, микроскопический полиартериит, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, тяжёлую миастению, синдром пляшущих глаз, неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, обыкновенную пузырчатку, узелковый полиартериит, полимиалгию, ревматоидный артрит, синдром Рейтера, синдром Шегрена, височный артериит, гранулематоз Вегенера, аутоиммунную гемолитическую анемию, интерстициальный цистит, болезнь Лайма, очаговую склеродермию, псориаз, склеродермию, неспецифический язвенный колит и витилиго.

Средства могут быть использованы для лечения опосредованных Т-клетками заболеваний гиперчувствительности, имеющих воспалительный компонент. Такие состояния включают контактную гиперчувствительность, контактный дерматит (в том числе вызванный ядовитым плющом), крапивницу, кожную аллергию, респираторные аллергии (сенную лихорадку, аллергический ринит) и чувствительную к глютену энтеропатию (целиакию).

Другие воспалительные состояния, которые можно лечить с помощью средств включают, например, аппендицит, дерматит, дерматомиозит, эндокардит, фиброзит, гингивит, глоссит, гепатит, гнойный гидраденит, ирит, ларингит, мастит, миокардит, нефрит, отит, панкреатит, паротит, перикардит, перитонит, фарингит, плеврит, пневмонит, воспаление предстательной железы, пиелонефрит и стоматит, отторжение трансплантата (с участием таких органов, как почка, печень, сердце, легкое, поджелудочная железа (например, островковые клетки), костный мозг, роговица, тонкая кишка, кожные аллотрансплантаты, кожные гомотрансплантаты и ксенотрансплантаты

сердечного клапана, сывороточная реакция и реакция «трансплантат против хозяина»), острый панкреатит, хронический панкреатит, острый респираторный дистресс-синдром, синдром Сезари, врожденную гиперплазию надпочечников, подострый тиреоидит, гиперкальциемию, связанную с раком, обыкновенную пузырчатку, буллезный герпетиформный дерматит, многоформную эритему, эксфолиативный дерматит, себорейный дерматит, сезонный или круглогодичный аллергический ринит, бронхиальную астму, контактный дерматит, атопический дерматит, реакции сверхчувствительности к лекарствам, аллергический конъюнктивит, кератит, опоясывающий герпес с поражением глаз, воспаление радужной оболочки глаза и иридоциклит, хориоретинит, неврит зрительного нерва, симптоматический саркоидоз, скоротечную или диссеминированную химиотерапию туберкулеза легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру у взрослых, вторичную тромбоцитопению у взрослых, приобретенную (аутоиммунную) гемолитическую анемию, лейкозы и лимфомы у взрослых, острый лейкоз детского возраста, региональный энтерит, аутоиммунный васкулит, рассеянный склероз, хроническую обструктивную болезнь легких, отторжение трансплантата солидных органов, сепсис. Предпочтительные способы лечения включают лечение отторжения трансплантата, ревматоидного артрита, псориатического артрита, рассеянного склероза, диабета 1 типа, астмы, воспалительного заболевания кишечника, системной красной волчанки, псориаза, хронического заболевания легких и воспаления, сопровождающегося инфекционными состояниями (например, сепсиса).

В одном аспекте заболевание или состояние, подлежащее лечению с использованием соединений в соответствии с изобретением, представляет собой рак. Примеры раковых заболеваний и состояний, при которых соединения

формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты могут иметь потенциально благоприятные противоопухолевые эффекты включают, но не ограничиваются ними, рак легкого, костей, поджелудочной железы, кожи, головы, шеи, матки, яичников, желудка, толстой кишки, груди, пищевода, тонкой кишки, кишечника, эндокринной системы, щитовидной железы, парашитовидной железы, надпочечника, мочеиспускательного канала, предстательной железы, полового члена, яичек, мочеточника, мочевого пузыря, почки или печени; рак прямой кишки; рак анальной области; карциномы маточных труб, эндометрия, шейки матки, влагалища, вульвы, почечной лоханки, почечно-клеточный рак; саркому мягких тканей; миксомы; рабдомиому; фиброму; липому; тератомы; холангиокарциному; гепатобластому; ангиосаркому; гемангиому; гепатоаденому; фибросаркому; хондросаркому; миелому; хронический или острый лейкоз; лимфоцитарные лимфомы; первичную лимфому ЦНС; новообразования ЦН; опухоли спинного мозга; плоскоклеточную карциному; синовиальную саркому; злокачественные плевральные мезотелиомы; глиому ствола головного мозга; аденому гипофиза; бронхиальную аденому; хондроматозную ханлартому; эндотелиому; болезнь Ходжкина или комбинацию одного или нескольких из вышеуказанных видов рака.

Преимущественными видами рака, которые можно лечить соединениями в соответствии с изобретением, являются рак кожи, легких, печени, толстой кишки, головного мозга, молочной железы, яичников, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, желудка, головы, шеи и рак уротелия, а также лимфома и лейкемия.

Новые соединения могут быть использованы для профилактики, кратковременного или долгосрочного лечения вышеупомянутых заболеваний, по выбору также в сочетании с хирургическим вмешательством, лучевой терапией или другими «передовыми» соединениями, такими как, например, цитостатические или цитотоксические вещества, ингибиторами пролиферации клеток, антиангиогенными веществами, стероидами или антителами.

При их роли в качестве адъювантов в некоторых вариантах осуществления данные соединения и композиции могут быть применены в качестве адъювантов в терапевтической или профилактической стратегии с использованием вакцины (вакцин). Таким образом, по существу чистые CDN в соответствии с настоящим

изобретением, или пролекарства или их фармацевтически приемлемые соли могут быть применены вместе с одной или несколькими вакцинами, выбранными для стимуляции иммунного ответа на один или несколько заранее определенных антигенов. По существу чистые CDN в соответствии с настоящим изобретением, или их пролекарства или их фармацевтически приемлемые соли, могут быть предоставлены вместе или в дополнение к таким вакцинам.

Такая вакцина(ы) может содержать инаktivированные или аттенуированные бактерии или вирусы, содержащие представляющие интерес антигены, очищенные антигены, живые векторы вирусной или бактериальной доставки, рекомбинантно спроектированные для экспрессии и/или секретирования антигенов, векторы антигенпредставляющих клеток (APC), содержащие клетки, которые нагружены антигенами или трансфицированные композицией, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антигены, носители для доставки липосомального антигена или открытые векторы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигены. Этот список не является ограничивающим. Например, такая вакцина(ы) может также включать инаktivированную опухолевую клетку, которая экспрессирует и секретирует один или несколько GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, лиганд FLT-3, цитокины.

Диапазон доз соединений общей формулы (I), вводимых в сутки, обычно составляет от 0,00 01 до 10 мг на кг массы тела, например, от 0,00001 до 1 мг на кг массы тела пациента. Каждая дозированная лекарственная форма может обычно содержать от 0,001 до 1000 мг, например, от 0,001 до 100 мг.

Разумеется, фактическое терапевтически эффективное количество или терапевтическая дозировка будет зависеть от факторов, известных специалистам в данной области техники, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае соединение или композицию следует вводить в дозах и путем, который позволяет доставить терапевтически эффективное количество в соответствии с конкретным состоянием пациента.

В соответствии с изобретением соединения, композиции, включая любые комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами могут быть введены через слизистую оболочку (например, перорально, подъязычно, вагинально, назально, цервикально и т.д.), внутриопухолевым, периопухолевым, трансдермальным, ингаляционным или парентеральным (например, подкожные, внутривенные, внутримышечные,

внутриартериальные, внутрικοжные, внутриоболочечные и эпидуральные введения) путем. В большинстве случаев можно использовать один из внутривенных, внутриопухолевых, перипухолевых или подкожных путей введения.

5 Соединения настоящего изобретения проявляют несколько преимуществ, таких как благоприятная связывающая аффинность со STING человека, благоприятная клеточная, то есть в клетках, несущих различные аллели STING человека, благоприятная стабильность в клеточных анализах.

10 Таким образом, в другом аспекте в изобретении предложены новые соединения формулы (I), включая их фармацевтически приемлемые соли, которые индуцируют выработку цитокинов зависимым от STING способом *in vitro* и/или *in vivo* и обладают пригодными фармакологическими и фармакокинетическими свойствами для использования в терапии, то есть для применения в качестве лекарственного средства.

15 В другом аспекте изобретение обеспечивает новые соединения формулы (I), включая их фармацевтически приемлемые соли, для применения в лечении заболевания или состояния, связанного с или модулированного посредством STING.

20 В другом аспекте изобретение обеспечивает новые соединения формулы (I), или их фармацевтически приемлемые соли, для лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, например, аллергического ринита или астмы, для лечения инфекционных заболеваний или рака, или для использования в качестве адъювантов для вакцин.

25 В другом аспекте изобретение обеспечивает применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемых солей в изготовлении лекарственного средства для применения в лечении заболевания или состояния, при котором модуляция STING является благотворной.

30 В другом аспекте изобретение обеспечивает применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемых солей в изготовлении лекарственного средства для применения в лечении воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, например, аллергического ринита или астмы, для лечения инфекционных заболеваний или рака.

Соответственно, настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I) в качестве лекарственного средства.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I) в способе лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING у пациента, предпочтительно у человека.

5 Кроме того, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (I) в способе лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, например, аллергического ринита или астмы, для лечения инфекционных заболеваний или рака.

10 В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с или модулированного посредством STING у млекопитающего, который включает стадию введения пациенту, предпочтительно человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

15 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или состояния, связанного с или модулированного посредством STING, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

20 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, например, аллергического ринита или астмы, для лечения инфекционных заболеваний или рака, у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

25 В связанном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции, стимуляции или адъювантирования иммунного ответа у индивидуума. Эти способы включают введение индивидууму по существу чистых CDN настоящего изобретения, или пролекарств или их фармацевтически приемлемых солей.

30 В другом аспекте изобретение обеспечивает применение соединения формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления иммуногенной композиции, содержащей антиген или композицию антигенов для лечения или предупреждения заболевания.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения заболевания, включающий в себя введение человеческому

субъекту, страдающему от или подверженному заболеванию, иммуногенной композиции, содержащей антиген или композицию антигенов и соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом аспекте изобретение обеспечивает вакцинную композицию, содержащую антиген или композицию антигенов и соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении или предупреждении заболевания.

В другом аспекте изобретение обеспечивает применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления вакцинной композиции, содержащей антиген или композицию антигенов, для лечения или предупреждения заболевания.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения заболевания, включающий в себя введение человеческому субъекту, страдающему от или подверженному заболеванию, вакцинной композиции, содержащей антиген или композицию антигенов и соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящего изобретения обнаружено, что фармацевтические композиции вышеуказанных соединений могут быть составлены так, чтобы они были пригодны для введения терапевтически эффективных количеств указанных ингибиторов для лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING.

Для целей настоящего описания фармацевтические композиции могут быть введены различными способами, включая непарентеральное, парентеральное, посредством ингаляционного спрея, местное или ректальное введение в составах, содержащих фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и лекарственные основы. Внутриопухолевое (непосредственно в опухолевую массу) или периопухолевое (вокруг опухолевой массы) введение соединений в соответствии с настоящим изобретением может непосредственно активировать локально инфильтративную ДК, непосредственно стимулировать апоптоз опухолевых клеток или повышать чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическим агентам.

Фармацевтические композиции настоящего описания могут быть представлены в форме стерильного инъеклируемого препарата, такого как

стерильная водная или масляная суспензия для инъекций. Эта суспензия может быть приготовлена в соответствии с известным уровнем техники с использованием тех пригодных диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые были упомянуты выше. Стерильный
5 инъецируемый препарат также может представлять собой стерильный инъецируемый раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, таком как раствор в 1,3-бутан-диоле или приготовленный в виде лиофилизированного порошка. Среди приемлемых лекарственных основ и растворителей, которые могут быть использованы,
10 находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителей или суспендирующей среды могут быть использованы стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. К тому же в препаратах для инъекций равным образом можно применять жирные
15 кислоты, такие как олеиновая кислота.

Составы, пригодные для местного применения в полости рта включают таблетки для рассасывания, содержащие активное вещество в ароматизированной основе, обычно сахарозе и акации или трагаканте; пастилки, содержащие активное вещество в инертной основе, такой как желатин и
20 глицерин, или сахароза и акация; и жидкости для полоскания рта, содержащие активное вещество в пригодном жидком носителе.

Составы, пригодные для вагинального введения, могут быть представлены в виде маточных колец, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или составов для распыления, содержащих в дополнение к активному веществу такие носители,
25 которые известны в данной области техники как приемлемые.

Составы, предназначенные для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают композицию изотонической с кровью
30 предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители. Составы могут быть представлены в герметичных контейнерах с единичными или многократными дозами, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в условиях сублимационной сушки (лиофилизированных), требующих только

добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного типа.

5 Таким образом, в соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие одно или большее количество соединений формулы (I), или их фармацевтически приемлемые соли, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

10 Кроме того, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING у пациента, предпочтительно у человека.

15 В соответствии с одним вариантом осуществления второго аспекта настоящего изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, которая содержит одно или большее количество указанных выше соединений, или их фармацевтически приемлемых солей, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей для применения в способе лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING.

20 В соответствии с другим вариантом осуществления предлагается вакцина, содержащая одно или большее количество соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли.

25 В другом аспекте изобретение обеспечивает адъювант для вакцины, содержащий соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

 В другом аспекте изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую антиген или композицию антигенов и соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

30 В другом аспекте изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую антиген или композицию антигенов и соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении или предупреждения заболевания.

В соответствии с другим вариантом осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая одно или большее количество соединений формулы (I), или их фармацевтически приемлемые соли, и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей. Предпочтительно, эта композиция содержит одно соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств.

Комбинированная терапия

Соединения в соответствии с изобретением могут быть использованы сами по себе или же их можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми наполнителями в количестве, достаточном для того, чтобы вызывать, модифицировать или стимулировать соответствующий иммунный ответ. Иммунный ответ может включать, без ограничения, специфический иммунный ответ, неспецифический иммунный ответ, как специфический, так и неспецифический ответ, врожденный ответ, первичный иммунный ответ, адаптивный иммунитет, вторичный иммунный ответ, иммунный ответ памяти, активацию иммунных клеток, пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку иммунных клеток и экспрессию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления соединения и их композиции, описанные в настоящей заявке, вводят в сочетании с одной или несколькими дополнительными композициями, включая вакцины, предназначенные для стимуляции иммунного ответа на один или несколько заранее определенных антигенов; адъюванты; антагонисты пути CTLA-4 и PD-1, липиды, липосомы, химиотерапевтические средства, иммуномодулирующие клеточные линии и т.д.

Описанные в настоящей заявке соединения и композиции могут быть введены до, после и/или одновременно с дополнительной терапевтической или профилактической композицией или средством. К ним относят, без ограничения, костимулирующую молекулу B7, интерлейкин-2, интерферон- γ , GM-CSF, антагонисты CTLA-4, лиганд OX-40/OX-40, лиганд CD40/CD40, сарграмостим, левамизол, вирус коровьей оспы, бациллу Кальмета-Герена (BCG), липосомы, квасцы, полный или неполный адъювант Фрейнда, детоксифицированные эндотоксины, минеральные масла, поверхностно-активные вещества, такие как липолецитин, плуроновые полиолы, полианионы, пептиды и масляные или

углеводородные эмульсии. Предпочтительными являются носители для индукции Т-клеточного иммунного ответа, которые преимущественно стимулируют цитолитический Т-клеточный ответ по сравнению с гуморальным иммунным ответом, хотя можно также использовать носители, которые стимулируют оба типа ответа. В тех случаях, когда агент представляет собой полипептид, может быть введен сам полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид. Носителем может быть клетка, такая как антигенпредставляющая клетка (АРС) или дендритная клетка. Антигенпредставляющие клетки включают такие типы клеток, как макрофаги, дендритные клетки и В-клетки. Другие профессиональные антигенпредставляющие клетки включают моноциты, клетки Купфера маргинальной зоны, микроглию, клетки Лангерганса, переплетающие дендритные клетки, фолликулярные дендритные клетки и Т-клетки. Также могут быть использованы факультативные антигенпредставляющие клетки. Примеры факультативных антигенпредставляющих клеток включают астроциты, фолликулярные клетки, эндотелий и фибробласты. Носителем может быть бактериальная клетка, которая трансформируется для экспрессии полипептида или для доставки полинуклеотида, который впоследствии экспрессируется в клетках вакцинированной особи. Адъюванты, такие как гидроксид алюминия или фосфат алюминия, могут быть добавлены для увеличения способности вакцины запускать, усиливать или продлевать иммунный ответ. Дополнительные материалы, такие как цитокины, хемокины и последовательности бактериальных нуклеиновых кислот, такие как CpG, агонист толл-подобных рецепторов (TLR) 9, а также дополнительные агонисты для TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, включая липопроtein, LPS, монофосфорилипид А, липотейхоевая кислота, имиквимод, резиквимод, и кроме того, агонисты индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG-I), такие как поли I:C, используемые отдельно или в сочетании с описанными композициями, также являются потенциальными адъювантами. Другие типичные примеры адъювантов включают синтетический адъювант QS-21, содержащий гомогенный сапонин, очищенный из коры *Quillaja saponaria* и *Corynebacterium parvum* (McCune et al., Cancer, 1979; 43:1619).

Способы совместного введения с дополнительным терапевтическим средством хорошо известны в данной области (Hardman, et al. (изд.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10-е изд.,

McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (изд.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner и Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA). Как
5 правило, совместное введение или введение вместе означает лечение субъекта двумя или большим количеством средств, где средства можно вводить одновременно или в разное время. Например, такие средства могут быть доставлены одному субъекту в виде отдельных введений, которые могут происходить, по сути, в одно и то же время или в разное время, и которые можно
10 осуществлять одним и тем же путем или различными путями введения. Такие средства могут быть доставлены одному субъекту в виде одного и того же введения (например, в одной и той же композиции), так что их вводят в одно и то же время одним и тем же путем введения.

Благодаря адъювантным свойствам соединений в соответствии с настоящим
15 изобретением, их применение также можно сочетать с другими терапевтическими методами, включая другие вакцины, адъюванты, антигены, антитела и иммуномодуляторы. Примеры приведены ниже.

Адъюванты

Вдобавок к соединениям в соответствии с настоящим изобретением и их
20 композициям, описанным в настоящей заявке, композиции или способы в соответствии с настоящим изобретением дополнительно могут содержать одно или несколько дополнительных веществ, которые, в силу их природы, могут стимулировать или иным образом использовать иммунную систему для ответа на антигены рака, присутствующие в опухолевых клетках-мишенях. Такие
25 адъюванты включают, но не ограничиваются ними, липиды, липосомы, инактивированные бактерии, которые вызывают врожденный иммунитет (например, инактивированные или аттенуированные *Listeria monocytogenes*), композиции, которые опосредуют врожденную иммунную активацию через толл-подобные рецепторы (TLRs), (NOD)-подобные рецепторы (NLRs), индуцируемые ретиноевой кислотой генные (RIG)-I-подобные рецепторы
30 (RLRs), рецепторы лектинов С-типа (CLRs) и/или ассоциированные с патогеном молекулярные структуры («PAMPS»). Примеры PAMP включают липопротеины, липополипептиды, пептидогликаны, зимозан, липополисахариды, нейссерияльные порины, флагеллин, профиллин, галактоцерамиды,

мурамилдипептид. Пептидогликаны, липопротеины и липотейхоевые кислоты являются компонентами клеточной стенки грамположительных бактерий. Липополисахариды экспрессируются большинством бактерий, и одним из примеров является MPL. Флагеллин относится к структурному компоненту бактериальных жгутиков, который секретируется патогенными и комменсальными бактериями. Галактозилцерамид является активатором естественных киллерных Т-клеток (NKT). Мурамилдипептид является биоактивным пептидогликановым мотивом, общим для всех бактерий.

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунного ответа, таким как ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который выбирают из группы, включающей антагонист пути CTLA-4, антагонист пути PD-1, антагонист пути Tim-3, антагонист пути Vista, антагонист пути BTLA, антагонист пути LAG-3 или антагонист пути TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа выбран из группы, включающей анти-CTLA-4 антитело, анти-PD-1 антитело, анти-Tim-3 антитело, анти-Vista антитело, анти-BTLA антитело, анти-LAG-3 антитело или анти-TIGIT антитело.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с антагонистами пути CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют для лечения солидной опухоли или гематологического злокачественного новообразования. Считается, что CTLA-4 является важным негативным регулятором адаптивного иммунного ответа. Активированные Т-клетки активируют CTLA-4, который связывает CD80 и CD86 на антигенпредставляющих клетках с более высокой аффинностью, чем CD28, ингибируя таким образом стимуляцию Т-клеток, экспрессию гена IL-2 и пролиферацию Т-клеток. Противоопухолевые эффекты блокады CTLA4 наблюдали в мышинных моделях рака толстой кишки, метастатического рака предстательной железы и метастатической меланомы. В некоторых вариантах осуществления антагонист пути CTLA-4 представляет собой молекулу анти-CTLA-4 антитела, которое выбирают из группы, включающей тремелимумаб и ипилимумаб.

Ипилимумаб (антитело CTLA-4, также известное как MDX-010, CAS № 477202-00-9) и тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, ранее известное

как тицилимумаб, CP-675,206) являются гуманизированными моноклональными антителами, которые связываются с человеческим CTLA4 и предотвращают его взаимодействие с CD80 и CD86. Другие негативные иммунорегуляторы, на которые может воздействовать подобная стратегия, включают запрограммированную гибель клеток 1 (PD-1), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов, трансформирующий фактор роста бета, интерлейкин-10 и фактор роста эндотелия сосудов.

В некоторых вариантах осуществления соединения в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в комбинации с анти-CTLA-4 антителом и анти-PD-1 антителом. В одном варианте осуществления комбинация включает молекулу анти-PD-1 антитела, например, как описано в настоящей заявке, и анти-CTLA-4 антитела, например, ипилимумаба. Примерные дозы, которые можно использовать, включают дозу молекулы анти-PD-1 антитела приблизительно от 1 до 10 мг/кг, например, 3 мг/кг, и дозу анти-CTLA-4 антитела, например, ипилимумаба, приблизительно 3 мг/кг.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с антагонистами пути PD-1. В некоторых вариантах осуществления комбинацию используют для лечения солидной опухоли или гематологического злокачественного новообразования. PD-1 является еще одним негативным регулятором адаптивного иммунного ответа, который экспрессируется на активированных Т-клетках. PD-1 связывается с B7-H1 и B7-DC, и вовлечение PD-1 подавляет активацию Т-клеток. Противоопухолевые эффекты были продемонстрированы при блокаде пути PD-1. В литературных источниках сообщалось, что молекулы анти-PD-1 антител (например, ниволумаб (Opdivo[®]), пембролизумаб (Keytruda[®]) и пидилизумаб), и AMP-224 являются примерами блокаторов пути PD-1, которые могут найти применение в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антагонист пути PD-1 представляет собой молекулу анти-PD-1 антитела, которое выбирают из группы, включающей ниволумаб, пембролизумаб или пидилизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антагонист пути PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, область Fc последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой AMP-224 (B7-

DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO 2010/027827 и WO 2011/066342) является растворимым слитым рецептором PD-L2 Fc, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

В некоторых вариантах осуществления антагонист пути PD-1 представляет собой ингибитор PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой анти-PD-L1 антитело или анти-PD-L2 антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор анти-PD-L1 выбран из YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело MSB0010718C. MSB0010718C (также называемый A09-246-2; Merck Serono) представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с антагонистами пути TIM-3. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию применяют для лечения солидной опухоли или гематологического злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, антагонист пути TIM-3 представляет собой анти-TIM-3 антитело. В некоторых вариантах осуществления молекулы анти-TIM-3 антитела раскрыты в US 2015/0218274, опубликованной 6 августа 2015 г., под названием «Молекулы антител к TIM-3 и их применение».

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с антагонистами пути LAG-3. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют для лечения солидной опухоли или гематологического злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления антагонист пути LAG-3 представляет собой анти-LAG-3 антитело. В некоторых вариантах осуществления молекулы антител анти-LAG-3 раскрыты в US 2015/0259420, поданной 13 марта 2015 г., под названием «Молекулы антител к LAG-3 и их применение».

Агонисты Т-клеточных рецепторов

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с агонистом Т-клеточного рецептора, таким как агонист CD28, агонист OX40, агонист GITR, агонист CD137, агонист CD27 или агонист HVEM.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с агонистом CD27. Типичные агонисты CD27 включают

агонистическое антитело против CD27, например, как описано в публикации РСТ № WO 2012/004367.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с агонистом GITR. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию применяют для лечения солидной опухоли или гематологического злокачественного новообразования. Типичные агонисты GITR включают, например, слитые белки GITR и антитела анти-GITR (например, двухвалентные анти-GITR антитела).

Антагонисты TLR

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с агонистом толл-подобных рецепторов. Используемый в настоящей заявке термин «толл-подобный рецептор» (или «TLR») относится к члену семейства белков толл-подобных рецепторов или к его фрагменту, который распознает микробный продукт и/или инициирует адаптивный иммунный ответ. В одном варианте осуществления TLR активирует дендритную клетку (DC). Толл-подобные рецепторы (TLR) представляют собой рецепторы распознавания образов, которые первоначально были идентифицированы как сенсоры врожденной иммунной системы, распознающие микробные патогены. TLR содержат семейство консервативных мембранно-охватывающих молекул, содержащих эктодомен из обогащённых лейцином повторов, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TIR (Toll/IL-1R). TLR распознают различные структуры в микробах, часто называемые «PAMP» (ассоциированные с патогеном молекулярные структуры). Связывание лиганда с TLR вызывает каскад внутриклеточных сигнальных путей, которые индуцируют выработку факторов, вовлеченных в воспаление и иммунитет.

Агонисты TLR, известные в данной области и находящие применение в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ними, следующие:

Pam3Cys, агонист TLR-1/2;

CFA, агонист TLR-2;

MALP2, агонист TLR-2;

Pam2Cys, агонист TLR-2;

FSL-1, агонист TLR-2;

Hib-OMPC, агонист TLR-2;

полирибозиновая:полирибозитидиновая кислота (Poly I:C), агонист TLR-3;

полиаденозин-полиуридиловая кислота (poly AU), агонист TLR-3;

Полиинозиновая-Полицитидиловая кислота, стабилизированная поли-L-лизином и карбоксиметилцеллюлозой;

(Hiltonol[®]), агонист TLR-3;

5 монофосфориллипид А (MPL), агонист TLR-4;

LPS, агонист TLR-4;

бактериальный флагеллин, агонист TLR-5;

сиалил-Tn (STn), углевод, связанный с муцином MUC1 в ряде раковых клеток человека и агонист TLR-4;

10 имиквимод, агонист TLR-7;

резиквимод, агонист TLR-7/8;

локсорибин, агонист TLR-7/8; и

неметилованный CpG динуклеотид (CpG-ODN), агонист TLR-9.

Благодаря их адъювантным качествам, агонисты TLR предпочтительно
15 используют в комбинациях с другими вакцинами, адъювантами и/или иммуномодуляторами и их можно сочетать в различных комбинациях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления моно- или ди-FCDN-соединения, которые связываются со STING и индуцируют STING-зависимую активацию ТВК1 и инактивированную опухолевую клетку, которая экспрессирует и
20 секретирует один или несколько цитокинов, которые стимулируют индукцию, рекрутинг и/или созревание, как описано в настоящей заявке, можно вводить вместе с одним или несколькими агонистами TLR в терапевтических целях.

Терапевтические средства на основе антител

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в
25 комбинации с терапевтическими антителами. В некоторых вариантах осуществления механизм действия терапевтического антитела представляет собой антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). ADCC представляет собой механизм клеточно-опосредованной иммунной защиты, при котором эффекторная клетка иммунной системы активно лизировывает
30 клетку-мишень, антигены которой на мембранной поверхности связаны специфическими антителами. Это один из механизмов, посредством которых антитела, как часть гуморального иммунного ответа, могут действовать для ограничения и сдерживания инфекции. Классическая ADCC опосредуется естественными киллерными клетками (NK); макрофаги, нейтрофилы и

эозинофилы также могут опосредовать ADCC. ADCC является важным механизмом действия терапевтических моноклональных антител, включая трастузумаб и ритуксимаб, против опухолей. Соединения в соответствии с настоящим изобретением могут действовать как усиливающие действие ADCC.

5 Ниже приведен примерный список антител, которые можно использовать вместе с соединениями в соответствии с настоящим изобретением:

Муромонаб-CD3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, даклизумаб, ритуксимаб, ибритумомаб, тозитумомаб, цетуксимаб, трастузумаб, алемтузумаб, Lym-1 ипилимумаб, витаксин, бевацизумаб и абциксимаб.

10 Дополнительные терапевтические антитела, которые можно использовать в сочетании с соединениями в соответствии с настоящим изобретением, включают ингибитор рецепторов пролактина (PRLR), ингибитор HER3, ингибитор EGFR2 и/или EGFR4, ингибитор M-CSF, антитело анти-APRIL, или антитело анти-SIRP или антитело анти-CD47.

15 Химиотерапевтические средства

В дополнительных вариантах осуществления описанных в настоящей заявке способов, соединения в соответствии с настоящим изобретением применяют в комбинации с химиотерапевтическими средствами (например, низкомолекулярными фармацевтическими соединениями). Таким образом, 20 способы дополнительно включают введение субъекту эффективного количества одного или нескольких химиотерапевтических средств дополнительного лечения или комбинированного лечения. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько химиотерапевтических средств выбирают из группы, включающей ацетат абиратерона, альтретамин, ангидровинбластин, ауристатин, 25 бексаротен, бикалутамид, BMS 184476, 2,3,4,5,6-пентафтор-N-(3-фтор-4-метоксифенил)бензолсульфонамид, блеомицин, N,N-диметил-L-валил-L-валил-N-метил-L-валил-L-пролин-1-L-пролин-трет-бутиламид, кахектин, цемадотин, хлорамбуцил, циклофосфамид, 3',4'-дидегидро-4'-дезоксиг-8'-норвин-калеукобластин, доцетаксол, доксетаксел, циклофосфамид, карбоплатин, 30 кармустин, цисплатин, криптофицин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, даунорубицин, децитабин, доластатин, доксорубицин (адриамицин), этопозид, 5-фторурацил, финастерид, флутамид, гидроксуреа и гидроксуреатаксаны, ифосфамид, лиарозол, лонидамин, ломустин (CCNU), энзалутамид, мехлорэтамин (азотистый иприт), мелфалан, изетионат

мивобулина, ризоксин, сертенеф, стрептозоцин, митомицин, метотрексат, таксаны, нилутамид, онапристон, паклитаксел, преднимустин, прокарбазин, RPR109881, фосфат страмустина, тамоксифен, тасонермин, таксол, третиноин, винбластин, винкристин, сульфат виндезина и винфлунин.

5 В дополнительных вариантах осуществления описанных в настоящей заявке способов, соединения в соответствии с настоящим изобретением применяют в комбинации с химиотерапевтическими средствами и/или дополнительными средствами для лечения показаний, как описано в способах настоящей заявки. В некоторых вариантах осуществления, соединения в соответствии с настоящим изобретением применяют в комбинации с одним или несколькими средствами, которые выбирают из группы, включающей сотрастурин, нилотиниб, 5-(2,4-дигидрокси-5-изопропилфенил)-N-этил-4-(4-(морфолинометил)фенил)изокса-
10 зол-3-карбоксамид, дактолисиб, 8-(6-метокси-пиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметил-фенил)-1,3-дигидро-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он, 3-(2,6-дихлор-3,5-диметоксифенил)-1-(6-((4-(4-этилпиперазин-1-ил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)-1-метилмочевина, бупарлисиб, 8-(2,6-дифтор-3,5-диметоксифенил)-N-(4-((диметиламино)метил)-1H-имидазол-2-ил)хиноксалин-5-карбоксамид, (S)-N1-(4-метил-5-(2-(1,1,1-трифтор-2-метилпропан-2-ил)пиридин-4-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1,2-дикарбоксамид,
20 (S)-1-(4-хлорфенил)-7-изопропокси-6-метокси-2-(4-(метил-(((1R,4S)-4-(4-метил-3-оксопиперазин-1-ил)циклогексил)метил)амино)фенил)-1,2-дигидроизохинолин-3(4H)-он, деферасирокс, летрозол, (4S,5R)-3-(2'-амино-2-морфолино-4'-(трифторметил)-[4,5'-бипиримидин]-6-ил)-4-(гидроксиметил)-5-метилоксазолидин-2-он, (S)-5-(5-хлор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)-6-(4-хлорфенил)-2-(2,4-диметокси-пиримидин-5-ил)-1-изопропил-5,6-
25 дигидропирроло[3,4-d]имидазол-4(1H)-он, 4-((2-(((1R,2R)-2-гидроксициклогексил)амино)бензо[d]тиазол-6-ил)окси)-N-метилпиколинамид, мезилат иматиниба, 2-фтор-N-метил-4-(7-(хинолин-6-илметил)имидазо[1,2-b][1,2,4]триазин-2-ил)бензамид, руксолитиниб, панобиностат, осилодростат, (S)-N-((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-фторбензоил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-2-(метиламино)пропанамид, (S)-N-((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-фторбензоил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-2-(метиламино)пропанамид, сонидегиб фосфат, церитиниб, 7-циклопентил-N,N-диметил-2-((5-(пиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)амино)-7H-пирроло[2,3-

d]пиримидин-6-карбоксамид, N-(4-((1R,3S,5S)-3-амино-5-метилциклогексил)пиридин-3-ил)-6-(2,6-дифторфенил)-5-фторпиколинамид, 2-(2',3-диметил-[2,4'-бипиридин]-5-ил)-N-(5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил)ацетамид, энкорафениб, 7-циклопентил-N,N-диметил-2-((5-((1R,6S)-9-метил-4-оксо-3,9-диазабицикло[4.2.1]-нонан-3-ил)пиридин-2-ил)амино)-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид, бинимтиниб, мидостаурин, эверолимус, 1-метил-5-((2-(5-(трифторметил)-1Н-имидазол-2-ил)пиридин-4-ил)окси)-N-(4-(трифторметил)фенил)-1Н-бензо[d]имидазол 2-амин, пасиреотид диаспартат, довитиниб, (R,E)-N-(7-хлор-1-(1-(4-(диметиламино)бут-2-еноил)азепан-3-ил)-1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)-2-метилизооникотинамид, N6 -(2-изопропокси-5-метил-4-(1-метилпиперидин-4-ил)фенил)-N4 -(2-(изопропилсульфонил)-фенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4,6-диамин, 3-(4-(4-((5-хлор-4-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)амино)-5-фтор-2-метилфенил)пиперидин-1-ил)тиэтан 1,1-диоксид, 5-хлор-N2 -(2-фтор-5-метил-4-(1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)пиперидин-4-ил)фенил)-N4 -(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиримидин-2,4-диамин, 5-хлор-N2-(4-(1-этилпиперидин-4-ил)-2-фтор-5-метилфенил)-N4 -(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиримидин-2,4-диамин, вальсподар и сукцинат ваталаниба.

В других вариантах осуществления соединения в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинации с ингибитором РКС, ингибитором BCR-ABL, ингибитором HSP90, ингибитором PI3K и/или mTOR, ингибитором FGFR, ингибитором PI3K, ингибитором FGFR, ингибитором PI3K, ингибитором цитохрома P450 (например, ингибитором CYP17), ингибитором HDM2, ингибитором ароматазы, ингибитором p53 и/или взаимодействия p53/Mdm2 или ингибитором тирозинкиназы CSF-1R.

Пригодные препараты включают, например, таблетки, капсулы, суппозитории, растворы - в частности растворы для инъекции (п.к., в.в., в.м.) и инфузии - эликсиры, эмульсии или диспергируемые порошки. Содержание фармацевтически активного соединения (соединений) должно находиться в диапазоне от 0,1 до 90 мас. %, предпочтительно от 0,5 до 50 мас. % композиции в целом, т.е. в количествах, которые достаточны для достижения диапазона доз, указанного ниже. При необходимости указанные дозы могут быть введены несколько раз в сутки.

Доза для упомянутых выше компонентов по комбинации обычно составляет 1/5 от самой низкой обычно рекомендуемой дозы до 1/1 от обычно рекомендуемой дозы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с или модулированного посредством, или на которые можно оказывать влияние модуляцией STING у пациента, причем указанный способ включает в себя стадию введения пациенту, предпочтительно человеку, который нуждается в таком лечении терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением в сочетании с терапевтически эффективным количеством одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, описанных в настоящем документе выше.

Применение соединения в соответствии с изобретением в комбинации с дополнительным терапевтическим средством может происходить одновременно или с перерывами во времени.

Соединение в соответствии с изобретением и одно или несколько дополнительных терапевтических средств могут оба присутствовать вместе в одном составе или отдельно в двух одинаковых или разных составах, например, в виде так называемого набора компонентов.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и один или большее количество фармацевтически приемлемых наполнителей.

В другом аспекте изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для применения в терапии.

В другом аспекте изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, и по

меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для применения в лечении заболевания или состояния, при котором модуляция STING является благотворной.

5 В другом аспекте изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для применения в лечении воспаления, аллергических и аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний и рака.

10 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или состояния, при котором модуляция STING является благотворной у пациента, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

15 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака у пациента, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества комбинации, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

20 Конечно же, фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза будут зависеть от факторов, известных специалистам в данной области техники, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае комбинацию следует вводить в дозах и

25 путем, который позволяет доставить фармацевтически эффективное количество в соответствии с конкретным состоянием пациента.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит соединение в соответствии с изобретением и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств,

30 описанных выше и в дальнейшем, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут понятными из следующих более подробных примеров, которые иллюстрируют, в качестве примера, принципы в соответствии с изобретением.

Примеры и экспериментальные данные

Следующие примеры приведены только с целью иллюстрации изобретения и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

5	В настоящей заявке используют следующие сокращения:	
	водн.	водный
	Bz	бензоил
	CEP	(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит
	DA	диодная матрица
	ДХМ	дихлорметан
	DDTT	3-((N,N-диметил-аминометилиден)амино)-3Н-1,2,4- дитиазол-3-тион
	dmf	N,N-диметилформамидинил
	DMOCP	2-хлор-5,5-диметил-2-оксо-1,3,2-диоксафосфоринан
	DMCO	диметилсульфоксид
	DMTr	4,4'-диметокситритил
	ЭРИ	электрораспылительная ионизация
	экв.	молярный эквивалент
	ч.	час
	ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
	ЖХ	жидкостная хроматография
	LNA	блокированная нуклеиновая кислота
	m/z	отношение массы к заряду
	MeOH	метанол
	мин	минута
	МС	масс-спектрометрия
	NH ₄ OH	раствор NH ₃ в воде
	ЯМР	ядерный магнитный резонанс
	част. на млн.	частиц на миллион
	s	синглет
	Раств.	растворитель
	TEA	триэтиламин
	TEAB	триэтиламмония бикарбонат

TEAF	триэтиламмония формиат
TFA	трифторуксусная кислота
By	время удерживания в минутах
УФ	ультрафиолет
Vis	видимый

Общие технические замечания

Термины «температура окружающей среды» и «комнатная температура» используют взаимозаменяемо и обозначают температуру около 20 °С, например, от 15 до 25 °С.

Как правило, спектры ^1H ЯМР и/или масс-спектры были получены из приготовленных соединений. Если не указано иное, то все хроматографические операции осуществляли при комнатной температуре. Во время синтеза циклического динуклеотида испарение растворителей обычно осуществляли роторным испарением под сниженным давлением при температуре водяной бани, не превышающей 35°C. Кроме того, во время синтеза циклического динуклеотида реакции проводили в атмосфере азота или аргона.

Рентгеновские структуры Примера 1.1 (улучшенное связывание со STING человека по сравнению с примером 1.2) и Примера 2.1 (улучшенное связывание со STING человека по сравнению с примером 2.2) в комплексе со STING человека предполагают, что оба атома люминофора имеют конфигурацию R_p. Аналогичным образом предполагается, что Пример 3.1 (улучшенное связывание со STING человека по сравнению с другими диастереомерами из Примера 3) и Пример 4.1 (улучшенное связывание с STING человека по сравнению с Примером 4.2 также имеют конфигурацию R_p на обоих атомах люминофора.

А) Аналитические методы

Аналитические данные ЖХ-МС:

Название метода: Система А

ВЭЖХ-Система: VWR / Hitachi: L-2130 Pump; VWR / Hitachi: автоматический пробоотборник L-2200; VWR / Hitachi: колоночный термостат L-2300; VWR / Hitachi: L-2450 детектор на диодной матрице; Agilent: OpenLab
МС-Система: Bruker Esquire ЖХ 6000 спектрометр
Колонка: Kromasil 100-5 C₈, 5 мкм, 50 мм x 3 мм.

Скорость потока: 0,4 мл/мин, 35°C, диапазон УФ-обнаружения: 220 - 300 нм

Масс-спектр: записан на масс-спектрометре с использованием отрицательной и положительной ЭРИ

5 Растворители: А: ацетонитрил

В: вода

С: 20 мМ NH₄HCO₃ (рН 5,5) в воде

Градиент:	Время	А%	В%	С%
	0	2	93	5
10	20	60	35	5
	23	95	0	5
	24	2	93	5
	30	2	93	5

15 Получение образцов: образцы (2 мкл – 20 мкл) растворяли в 87,5 мкл ацетонитрила и 262.5 мкл воды, объём введенной пробы 2 мкл – 5 мкл.

Название метода: Z011_S03

Описание устройства: Agilent 1200 м DA- и MC-детектором

Колонка: XBridge C18_3.0x30 мм, 2.5 мкм

20 Производитель колонки: Waters

Описание:

	Градиент/Раств-ль	% Раств. [H ₂ O]	% Раств. [Ацетонитрил]	Поток [мл/мин]	Т [°C]
	Время [мин]	0.1% NH ₄ OH]			
25	0.0	97.0	3.0	2.2	60.0
	0.2	97.0	3.0	2.2	60.0
	1.2	0.0	100.0	2.2	60.0
	1.25	0.0	100.0	3.0	60.0
	1.4	0.0	100.0	3.0	60.0

30

Название метода: Z017_S04

Описание устройства: Agilent 1200 с DA- и MC-детектором

Колонка: StableBond C18_3.0x30 мм, 1.8 мкм

Производитель колонки: Agilent

Описание:

	Градиент/Раств-ль	% Раств.	% Раств. [Ацетонитрил]	Поток [мл/мин]	Т [°C]
	Время [мин]	[H ₂ O 0,1% TFA]			
5	0.0	97.0	3.0	2.2	60.0
	0.2	97.0	3.0	2.2	60.0
	1.2	0.0	100.0	2.2	60.0
	1.25	0.0	100.0	3.0	60.0
	1.4	0.0	100.0	3.0	60.0

10 **Название метода: Z018_S04**

Описание устройства: Agilent 1200 с DA- и МС-детектором

Колонка: Sunfire C18_3.0x30 мм, 2.5 мкм

Производитель колонки: Waters

Описание:

	Градиент/Раств-ль	% Раств.	% Раств. [Ацетонитрил]	Поток [мл/мин]	Т [°C]
	Время [мин]	[H ₂ O 0.1% TFA]			
15	0.0	97.0	3.0	2.2	60.0
	0.2	97.0	3.0	2.2	60.0
	1.2	0.0	100.0	2.2	60.0
	1.25	0.0	100.0	3.0	60.0
20	1.4	0.0	100.0	3.0	60.0

Название метода: Z035_001

Описание устройства: Agilent 1200 с DA- и МС-детектором

25 Колонка: Atlantis T3, 4.6 x 50 мм, 3 мкм

Производитель колонки: Waters

Описание:

	Градиент/Раств-ль	% Раств. [H ₂ O	% Раств. [Ацетонитрил]	Поток [мл/мин]	Т [°C]
	Время [мин]	0.02 моль/л TEAF]			
30	0.0	98.0	2.0	1.0	25.0
	3.0	98.0	2.0	1.0	25.0
	12.0	80.0	20.0	1.0	25.0
	14.0	0.0	100.0	1.0	25.0

16.0 0.0 100.0 1.0 25.0

Аналитические конфигурации ВЭЖХ:

Название метода: Конфигурация А (Градиент ВЭЖХ)

5 VWR / Hitachi: Насос L-2130; VWR / Hitachi: Автоматический
пробоотборник L-2200; VWR / Hitachi: колоночный термостат L-2350
(установлен на 30°C); VWR / Hitachi: УФ/Vis детектор с переменной длиной
волны L-2400; EZChrom версия программного обеспечения 3.3.1 SP1.

10 YMC*GEL ODS-A 12 нм (10 мкм; 250 x 4 мм) канал А= 20 мм TEAF (pH
6.8) в воде; канал В= 100 % ацетонитрил, 20 мм TEAF (pH 6.8). Градиент: 0 мин
100 % А; 30 мин 100 % В; 40 мин 100 % В, 30°C; скорость потока: 1.0 мл/мин;
УФ 262 нм;

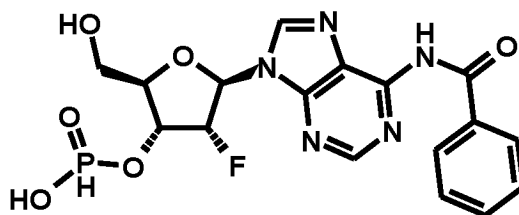
Спектроскопия ЯМР:

15 Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР): для спектров ^1H ,
химические сдвиги были отнесены к сигналу растворителя ДМСО (2,50 част. на
млн.) или для измерений в D_2O , к DSS (4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновая
кислота). На спектры ^{31}P ЯМР косвенно ссылались путем сравнения абсолютных
частот $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ (Bruker BioSpin GmbH, программное обеспечение: TopSpin, au
20 program: xsi). Все спектры ^{31}P ЯМР были записаны с разделением протонов.

В) Пути синтеза промежуточных соединений

Промежуточное соединение 1.1

5'-ОН-2'-F-3'-Н-фосфонат- N^6 -Bz-2'-деоксиаденозин



25 5'-DMTr-2'-F-3'-CEP- N^6 -Bz-2'-деоксиаденозин (полученный от ChemGenes,
0.654 г, 0.747 ммоль) растворяли в ацетонитриле (10 мл) и воде (0.033 мл, 1.50
ммоль, 2 экв.) при комнатной температуре. Добавляли трифторацетат пиридиния
(0.173 г, 0.896 ммоль, 1.2 экв.), и реакционную смесь перемешивали при
комнатной температуре в течение 10 минут. После этого добавляли *трет*-
30 бутиламин (10 мл, 95.7 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение 30 минут. Реакционную смесь выпаривали под сниженным давлением, повторно растворяли в безводном ацетонитриле (25 мл) и выпаривали под сниженным давлением. Остаток растворяли в дихлорметане (25 мл) и воде (0.134 мл, 7.44 ммоль, 10 экв.). Добавляли дихлоруксусную кислоту (0.555 мл, 6.73 ммоль, 9 экв.) в дихлорметане (25 мл) и полученный раствор оранжевого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Добавляли пиридин (1.31 мл, 13.6 ммоль, 18 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут.

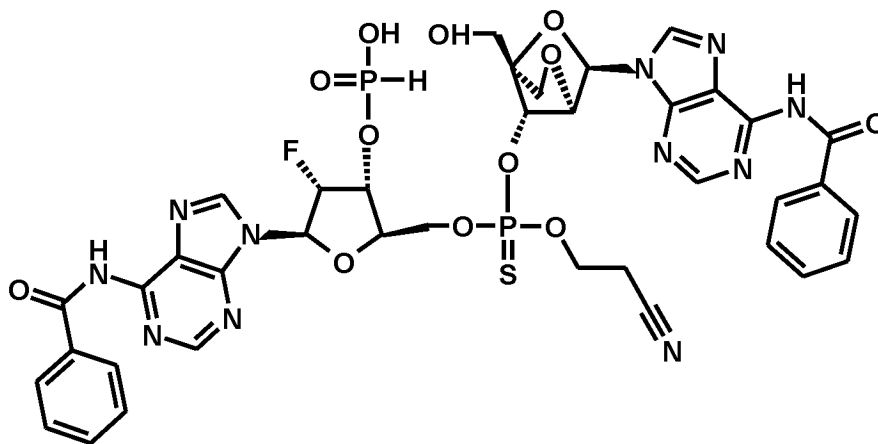
Аналитические данные ЖХ-МС реакционной смеси подтвердили наличие Промежуточного соединения 1.1.

ЖХ-МС (система А): Ву 4.22 мин; ЭРИ-МС: 438 $[M+H]^+$

Растворители выпаривали под сниженным давлением, и остаток подвергали азеотропной перегонке с безводным ацетонитрилом (4 x 15 мл). Во время последней процедуры выпаривания раствор концентрировали до прибл. 4 мл конечной азеотропной смеси. Полученный безводный раствор Промежуточного соединения 1.1 использовали непосредственно в следующей последовательности реакций.

Промежуточное соединение 1.2

Линейный димер 5'-OH-LNA-N⁶-Bz-аденозин-(3'→5')-цианоэтил-фосфотиоат-2'-F-3'-H-фосфонат-N⁶-Bz-2'-деоксиаденозин



5'-DMTr-3'-CEP-LNA-N⁶-Bz-аденозин (полученный от Exiqon, 0.998 г, 1.27 ммоль, 1.7 экв.) подвергали азеотропной перегонке с безводным ацетонитрилом (4 x 15 мл). Во время последней процедуры выпаривания раствор концентрировали до прибл. 4 мл конечной азеотропной смеси. Полученный раствор добавляли к Промежуточному соединению 1.1 (максимальное

теоретическое количество: 0.747 ммоль), растворенному в прибл. 4 мл безводного ацетонитрила при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Добавляли ((*N,N*-диметиламино-метилен)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазолин-3-тион (DDTT) (0.203 г, 0.823 ммоль, 1.1 экв.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Летучие компоненты выпаривали под сниженным давлением, а остаток растворяли в дихлорметане (25 мл) и воде (0.134 мл, 7.44 ммоль, 10 экв.). Добавляли дихлоруксусную кислоту (1.11 мл, 13.5 ммоль, 18 экв.) в дихлорметане (25 мл), и раствор оранжевого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Добавляли пиридин (10 мл), а реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут.

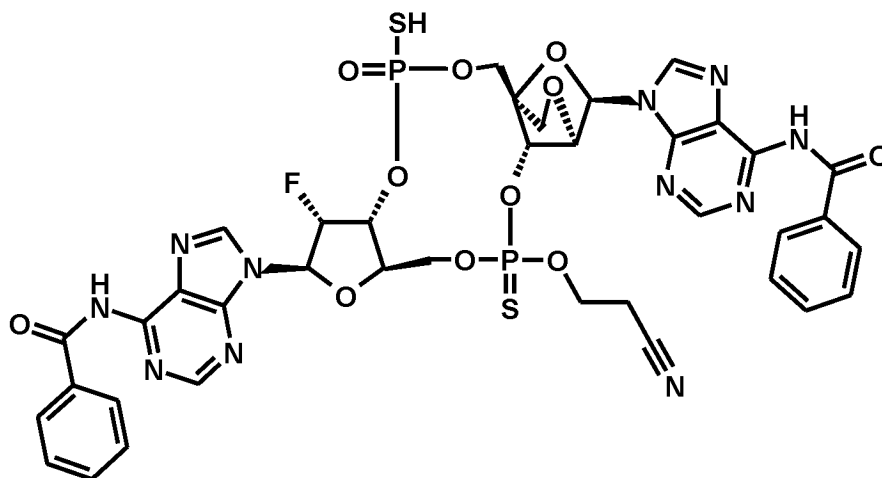
Аналитические данные ЖХ-МС реакционной смеси подтвердили наличие Промежуточного соединения 1.2 в виде смеси диастереомеров.

ЖХ-МС (система А): Ву 8.32, 8.53 мин; ЭРИ-МС: 952 $[M+H]^+$ для каждого диастереомера.

Колбу закупоривали, тщательно запечатывали и хранили при -70°C в течение 16 часов. Смесь выпаривали под сниженным давлением, а остаток совместно выпаривали с безводным пиридином (2 x 20 мл) под сниженным давлением. Добавляли еще порцию 40 мл безводного пиридина, и остаток концентрировали под сниженным давлением до прибл. 20 мл общего объема. Полученный безводный раствор Промежуточного соединения 1.2 использовали непосредственно в следующей последовательности реакций.

Промежуточное соединение 1.3

Циклический димер LNA-N⁶-Bz-аденозин-(3'→5')-цианоэтил-фосфоротиоат-2'-F-N⁶-Bz-2'-деоксиаденозин-(3'→5')-фосфоротиоат

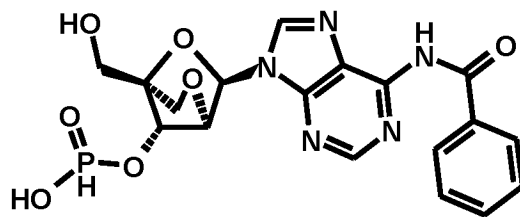


2-Хлор-5,5-диметил-1,3,2-диоксафосфоринан 2-оксид (DMOCP) (0.483 г, 2.62 ммоль, 3.5 экв.) добавляли к неочищенному Промежуточному соединению 1.2 (максимальное теоретическое количество: 0.747 ммоль) в безводном пиридине в общем объеме припл. 20 мл. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляли воду (0.470 мл, 26.1 ммоль, 35 экв.) и 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он (0.189 г, 1.12 ммоль, 1.5 экв.) и перемешивание продолжали при комнатной температуре. Через 30 минут, реакционную смесь выливали в раствор гидрокарбоната натрия (4.500 г, 53.6 ммоль) в 150 мл воды и взбалтывали при комнатной температуре в течение 5 минут, с последующим добавлением смеси этилацетата/метил-*трет*-бутилового эфира (150 мл, 1:1). Органическую фазу отделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали с этилацетатом/метил-*трет*-бутиловый эфир (2 x 80 мл, 1:1). Объединенные органические фазы сушили безводным сульфатом магния, с последующим выпариванием растворителей под сниженным давлением и совместно выпаривали со 100 мл безводного толуола. Оставшийся остаток дополнительно сушили *в вакууме*. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной флэш-хроматографии (160 г силикагеля, градиент 0–16,7% MeOH в дихлорметане) с получением Промежуточного соединения 1.3 в виде неочищенной смеси диастереомеров.

ЖХ-МС (система А): Ву = 9.91, 10.08 мин; ЭРИ-МС: 966 [M+H]⁺ для каждого диастереомера.

Промежуточное соединение 2.1

5'-ОН-3'-Н-фосфонат-LNA-N⁶-Bz-аденозин

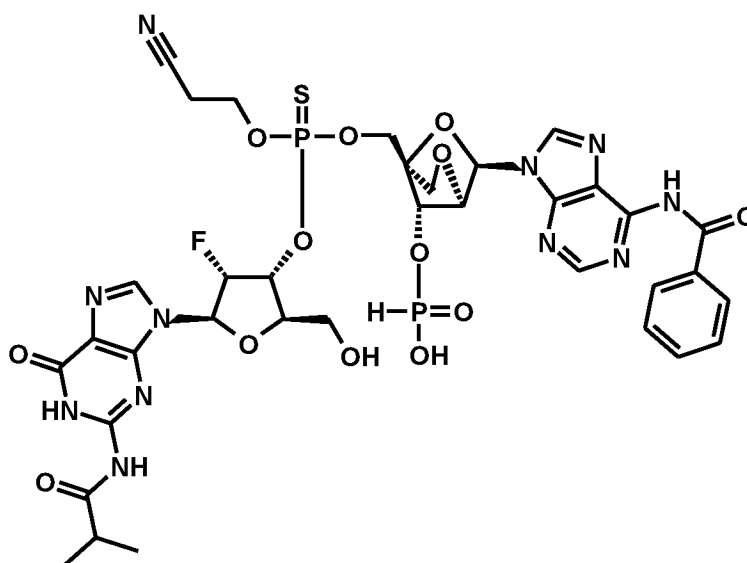


Промежуточное соединение 2.1 получали аналогичным образом как описано для Промежуточного соединения 1.1, исходя из 5'-DMTr-3'-CEP-LNA-N⁶-Bz-аденозина («LNA-A амидит», ЭКВ-0063-1000, полученный от Exiqon). Аналитические данные ЖХ-МС неочищенного продукта подтвердили наличие Промежуточного соединения 2.1.

ЖХ-МС (Z017_S04): В_y = 0.62 мин; ЭРИ-МС: 448 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение 2.2

Линейный димер 5'-ОН-2'-F-N²-изобутирил-2'-дезоксигуанозин-(3'→5')-цианозтил-фосфотиоат-3'-Н-фосфонат-LNA-N⁶-Bz-аденозин



5'-DMTr-2'-F-3'-CEP-N²-изобутирил-2'-дезоксигуанозин (ABCR AB350793, 1.85 г, 2.16 ммоль, 1.3 экв.) подвергали азеотропной перегонке с безводным ацетонитрилом (2 x 10 мл). Остаток растворяли в безводном ацетонитриле (10 мл) и концентрировали до прибл. 5 мл под сниженным давлением. Добавляли 10 штук молекулярного сита (3 Å) и полученную смесь добавляли к Промежуточному соединению 2.1 (максимальное теоретическое количество: 1.65

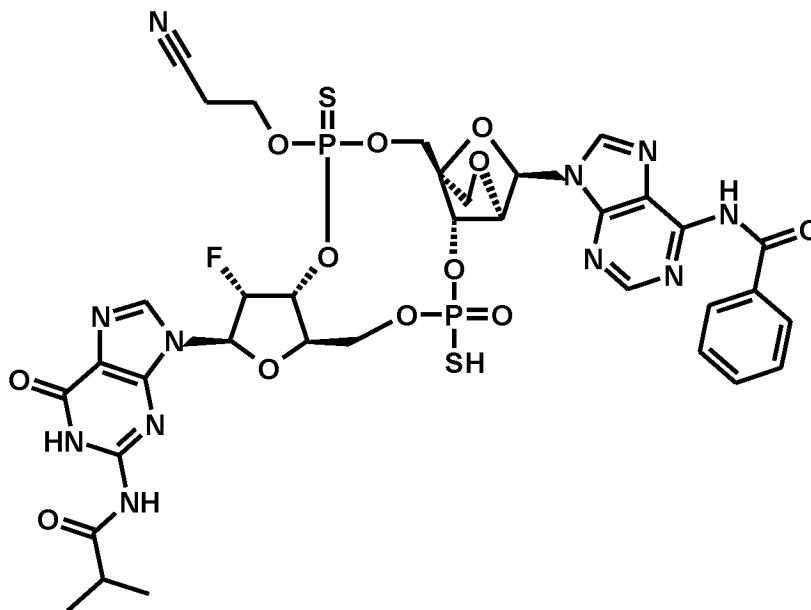
ммоль), растворенному в прибл. 3 мл безводного ацетонитрила при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 42 минут. Добавляли ((*N,N*-диметиламино-метилен)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазолин-3-тион (DDTT) (381 мг, 1.85 ммоль, 1.1 экв.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Летучие компоненты выпаривали *в вакууме*, а остаток растворяли в дихлорметане (20 мл) и воде (0.299 мл, 16.6 ммоль, 10 экв.). Добавляли дихлоруксусную кислоту в дихлорметане (6%, 20 мл) и полученный раствор оранжевого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого, добавляли пиридин (15 мл) и реакционную смесь выпаривали *в вакууме*.

Аналитические данные ЖХ-МС неочищенного продукта подтвердили наличие Промежуточного соединения 2.2.

ЖХ-МС (Z011_S03): $B_y = 0.60$ мин; ЭРИ-МС: 934 $[M+H]^+$

Промежуточное соединение 2.3

Циклический димер 2'-F-N²-изобутирил-2'-дезоксигуанозин-(3'→5')-цианозтил-фосфоротиоат-LNA-N⁶-Bz-аденозин-(3'→5')-фосфоротиоат



Неочищенное Промежуточное соединение 2.2 (максимальное теоретическое количество: 1.65 ммоль) растворяли в пиридине (36 мл), и раствор концентрировали до прибл. 20 мл *в вакууме*. Добавляли 2-хлор-5,5-диметил-1,3,2-диоксафосфоринан 2-оксид (DMOCP) (1134 мг, 6.15 ммоль, 3.7 экв.), и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли воду (1.03 мл, 57.1 ммоль, 34 экв.) и 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он (428

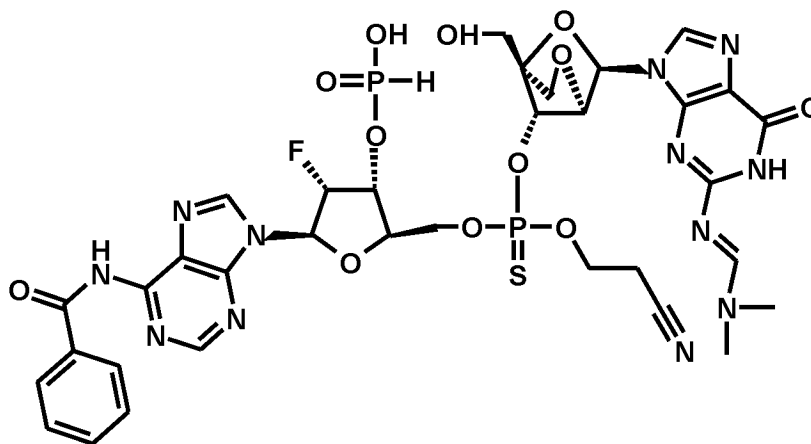
мг, 2.54 ммоль, 1.5 экв.) и перемешивание продолжали при комнатной температуре. Через 5 минут, реакционную смесь выливали в раствор гидрокарбоната натрия (4.00 г, 47.6 ммоль) в 140 мл воды и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут, с последующим добавлением смеси
5 этилацетата/метил-*трет*-бутилового эфира (140 мл, 1:1). Органическую фазу отделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали с этилацетатом/метил-*трет*-бутиловым эфиром (1:1) и несколько раз с дихлорметаном. Органические фазы объединяли, сушили безводным сульфатом магния, и летучие компоненты удаляли *в вакууме*.

Оставшийся остаток растворяли в минимальном объеме дихлорметана и очищали с помощью препаративной флэш-хроматографии (силикагеля, ДХМ/МеОН: градиент 100/0 → 70/30). Фракции анализировали посредством ВЭЖХ-МС. Содержащие продукт фракции объединяли, и растворитель удаляли
15 *в вакууме* с получением Промежуточного соединения 2.3 в виде сырой смеси диастереомеров.

ЖХ-МС (Z017_S04): Ву = 0.86 – 0.88 мин; ЭРИ-МС: 948 [M+H]⁺

Промежуточное соединение 3.1

Линейный димер 5'-OH-LNA-N²-dmf-гуанозин-(3'→5')-цианоэтил-фосфоротиоат-2'-F-3'-H-фосфонат-N⁶-Bz-2'-деоксиаденозин



К раствору Промежуточного соединения 1.1 (600 мг, 1.17 ммоль) добавляли раствор Activator 42 (0.1 М в ацетонитриле, 24 мл, 2.4 ммоль, 2.1 экв.). Через несколько минут 5'-DMTr-3'-CEP- LNA-N²-dmf-гуанозин-("LNA-G(dmf)-амидит", ЭКВ-0082-1000, полученный от Exiqon, 1.69 г, 1.98 ммоль, 1.7 экв.)
25 добавляли и смесь перемешивали в течение 45 мин. при комнатной температуре. Добавляли раствор фенилацетил дисульфида ("PADS", 710 мг, 2.35 ммоль, 2.0

экв.) в пиридине (10 мл), и смесь перемешивали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Летучие компоненты выпаривали *в вакууме*, и остаток подвергали азеотропной перегонке два раза с ацетонитрилом. Остаток растворяли в дихлорметане (14 мл) и воде (0.21 мл, 11.7 ммоль, 10 экв.).

5 Добавляли дихлоруксусную кислоту в дихлорметане (6%, 1.14 мл) и полученный раствор оранжевого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. После этого добавляли смесь пиридина (8 мл) и метанола (8 мл), и реакционную смесь выпаривали *в вакууме*. Оставшийся остаток растворяли в минимальном объеме дихлорметана и очищали с помощью препаративной флэш-

10 хроматографии (силикагеля, ДХМ/МеОН: Градиент 95/5 $\rightarrow$ 0/100). Фракции анализировали посредством ВЭЖХ-МС. Содержащие продукт фракции объединяли и растворитель удаляли *в вакууме* с получением неочищенного Промежуточного соединения 3.1.

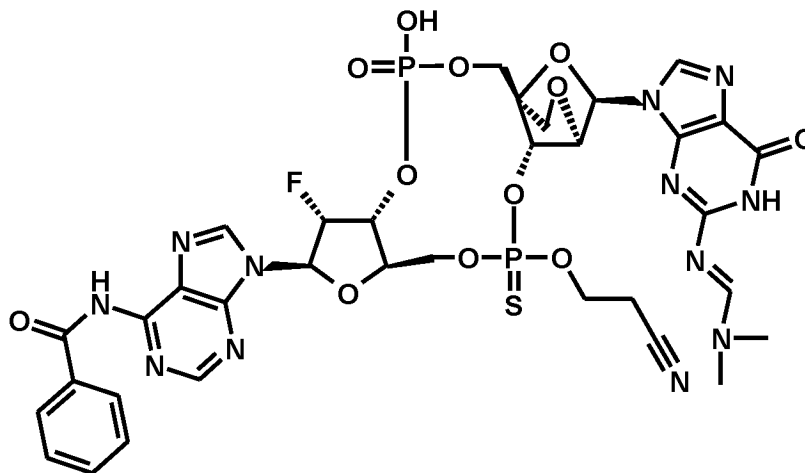
Аналитические данные ЖХ-МС неочищенного материала подтвердили

15 наличие Промежуточного соединения 3.1.

ЖХ-МС (Z017_S04): $B_u = 0.71$ мин; ЭРИ-МС: 919 $[M+H]^+$

Промежуточное соединение 3.2

Циклический димер LNA- N^2 -dmf-гуанозин-(3' $\rightarrow$ 5')-цианозтил-фосфоротиоат-2'-F- N^6 -Bz-2'-деоксиаденозин-(3' $\rightarrow$ 5')-фосфоротиоат



20 Неочищенное Промежуточное соединение 3.1 (максимальное теоретическое количество: 0.109 ммоль) подвергали азеотропной перегонке два раза с пиридином и растворяли в пиридине (4 мл). Добавляли пивалоилхлорид (0.050 мл, 0.41 ммоль, 3.7 экв.) и полученную смесь перемешивали при комнатной

25 температуре в течение 45 минут. Добавляли элементную серу (12 мг, 0.38 ммоль, 3.5 экв.) и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 45

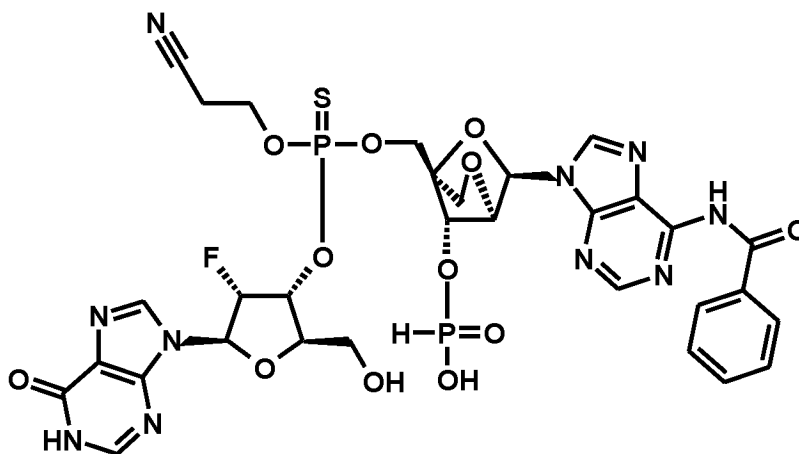
мин. Летучие компоненты выпаривали *в вакууме*, а остаток подвергали азеотропной перегонке два раза с толуолом. Оставшийся остаток растирали с ацетонитрилом и фильтровали. Фильтрат концентрировали под сниженным давлением и сушили *в вакууме* с получением Промежуточного соединения 3.2 в виде неочищенной смеси диастереомеров.

Аналитические данные ЖХ-МС материала подтвердили наличие Промежуточного соединения 3.2.

ЖХ-МС (Z017_S04): $V_u = 0.78$ мин; ЭРИ-МС: 933 $[M+H]^+$

Промежуточное соединение 4.1

Линейный димер 5'-ОН-2'-F-2'-деоксиинозин-(3'→5')-цианоэтил-фосфоротиоат-3'-Н-фосфонат-LNA-N⁶-Bz-аденозин



5'-DMTr-2'-F-3'-CEP-2'-деоксиинозин (MFCD22374068, Astatech, 2 г, 2.59 ммоль, 1.7 экв.) подвергали азеотропной перегонке с безводным ацетонитрилом (3 x 15 мл). Во время последней процедуры выпаривания раствор концентрировали до прибл. 5 мл конечной азеотропной смеси. Полученный раствор добавляли к Промежуточному соединению 2.1 (максимальное теоретическое количество: 1.53 ммоль), растворенному в прибл. 5 мл безводного ацетонитрила при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Другие операции для получения Промежуточного соединения 4.1 осуществляли аналогичным образом как описано для Промежуточного соединения 1.2.

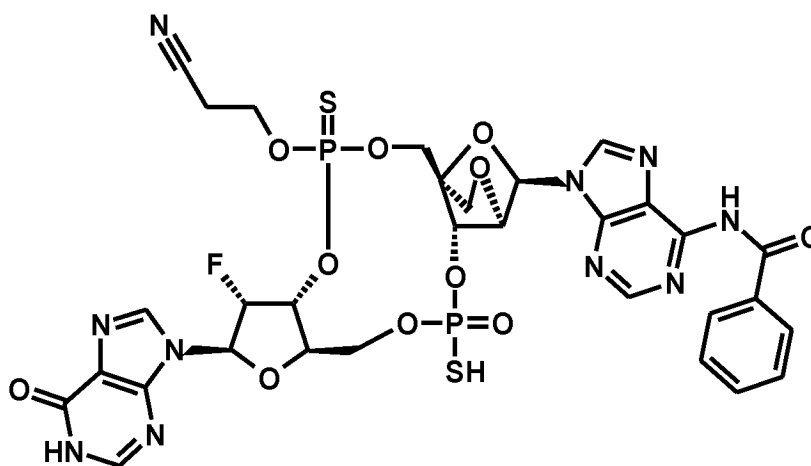
Аналитические данные ЖХ-МС неочищенного материала подтвердили наличие Промежуточного соединения 4.1.

ЖХ-МС (система А): $V_u = 7.67$ мин; ЭРИ-МС: 849 $[M+H]$

Колбу закупоривали, тщательно запечатывали и хранили при - 70°C в течение 16 часов. Смесь выпаривали под сниженным давлением, а остаток совместно выпаривали с безводным пиридином (2 x 20 мл) под сниженным давлением. Добавляли еще порцию 40 мл безводного пиридина, а остаток концентрировали под сниженным давлением до прибл. 20 мл общего объема. Полученный безводный раствор Промежуточного соединения 4.1 использовали непосредственно в следующей последовательности реакций.

Промежуточное соединение 4.2

Циклический димер 2'-F-2'-деоксиинозин-(3'→5')-цианозтил-фосфоротиоат-LNA-N⁶-Bz-аденозин-(3'→5')-фосфоротиоат



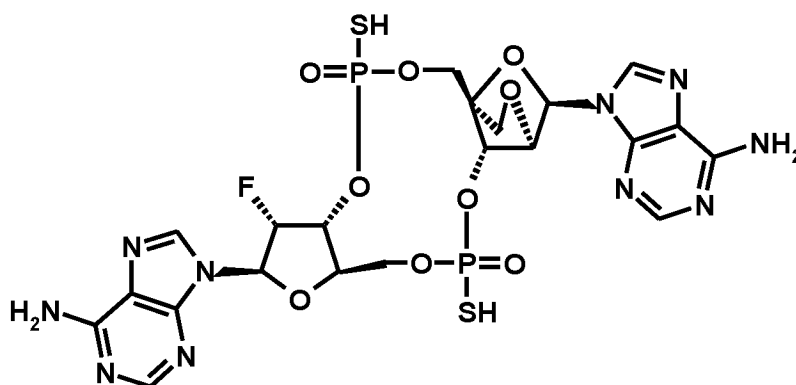
Синтез Промежуточного соединения 4.2 осуществляли аналогичным образом как описано для Промежуточного соединения 1.3. Неочищенную реакцию смесь выливали в раствор гидрокарбоната натрия (6.7 г, 79.8 ммоль) в 200 мл воды и взбалтывали при комнатной температуре в течение 5 минут. За этот период образовался содержащий продукт осадок и его отделяли фильтрацией. К фильтрату добавляли этилацетат (200 мл) и органическую фазу отделяли. Затем водную фазу экстрагировали три раза этилацетатом (3 x 200 мл). Объединенные органические фазы сушили безводным сульфатом магния, с последующим выпариванием растворителей под сниженным давлением. Добавляли содержащий исходный продукт осадок с последующим совместным выпариванием с 200 мл безводного толуола. После завершения этих операций неочищенный материал дополнительно сушили в вакууме. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной флэш-хроматографии (160 г

силикагеля, градиент 0–16,7% MeOH в ДХМ) с получением Промежуточного соединения 4.2 в виде смеси диастереомеров.

ЖХ-МС (система А): Ву = 9.14 мин, 9.28 мин; ЭРИ-МС: 863 $[M+H]^+$ для каждого диастереомера.

5 **С) Синтез Соединений в соответствии с изобретением**
Пример 1.1 и Пример 1.2

Циклический (LNA-аденозин-(3'→5')-фосфоротиоат-2'-F-2'-
деоксиаденозин-(3'→5')-фосфоротиоат)



10

33% метиламина в абсолютном этаноле (150 мл) добавляли к неочищенному циклическому димеру LNA-N⁶-Bz-аденозин-(3'→5')-цианоэтил-фосфоротиоат-2'-F-N⁶-Bz-2'-деоксиаденозин-(3'→5')-фосфоротиоат

15 (Промежуточное соединение 1.3; 0.36 г), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Все летучие компоненты выпаривали под сниженным давлением, а оставшийся остаток сушили *в вакууме*.

Добавляли 125 мл воды и полученную суспензию помещали в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Через 15 минут эту суспензию выливали в 100 мл хлороформа и органическую фазу отделяли. Эту экстракцию повторяли еще

20 два раза с хлороформом (2 x 100 мл). Объединенные органические фазы экстрагировали посредством 100 мл воды и объединенную содержащую продукт водную фазу фильтровали с помощью 0,45 мкм шприцевого фильтра Rotilabo®-

СМЕ (внешний диаметр: 33 мм). Раствор продукта разбавляли водой до 245 мл и наносили на анионообменную колонку Q Sepharose™ Fast Flow (40 – 165 мкм; 125 x 35 мм; ~120 мл) Cl⁻-форма, предварительно регенерированную

25 посредством 2 М хлорида натрия и промывали водой. Колонку промывали водой (2 объема колонки), с последующим градиентом 0 - 1 М буфера бикарбоната

триэтиламмония (TEAB, pH 7) в воде на 16,7 объемах колонки, с последующим ступенчатым градиентом с 2 М TEAB, pH 7 на объемах колонки 8,3 (длина волны обнаружения 254 нм). Пример 1.1 и Пример 1.2 элюировали с ~ 0.6 М TEAB - ~ 2.0 М TEAB. Содержащие продукт фракции осторожно концентрировали под сниженным давлением.

Разделение Примера 1.1 (второе элюирование) и Примера 1.2 (первое элюирование) осуществляли путем повторных полупрепаративных очисток с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Раствор продукта наносили на колонку YMC*GEL ODS-A 12 нм (10 мкм; 250 x 16 мм; ~50 мл), предварительно уравновешенную посредством 10 % ацетонитрила, 20 мм формиата триэтиламмония (TEAF, pH 6.8) в воде. Элюирование осуществляли посредством ступенчатого градиента 10 %, 12 % и 16 % ацетонитрилом, 20 мм TEAF (pH 6.8) в воде.

Получение Примера 1.1, натриевая соль («второй элюированный диастереомер»)

Обессоливание Примера 1.1, соль TEA, осуществляли с помощью препаративной жидкостной хроматографии среднего давления с обращенной фазой (MPLC). Раствор продукта (~50 мл) наносили на колонку Merck LiChroprep®RP-18 (15 – 25 мкм; 450 x 25 мм; ~220 мл), предварительно уравновешенную водой. Колонку промывали водой для удаления избытка буфера TEAF. После этого, 2 % 2-пропанола в воде применяли для элюирования обессоленного Примера 1.1. Содержащие продукт фракции частично концентрировали под сниженным давлением и затем наносили на катионообменную колонку SP Sepharose™ Fast Flow (45 – 165 мкм; 125 x 35 мм; ~120 мл) Na⁺-форма, предварительно регенерированную посредством 2 М хлорида натрия и промывали водой. Колонку промывали водой до тех пор, пока больше не было обнаружено УФ поглощения (длина волны детектирования 254 нм). Содержащие продукт фракции осторожно выпаривали под сниженным давлением и дополнительно сушили *в вакууме* с получением Примера 1.1 в виде натриевой соли.

ВЭЖХ (конфигурация А): $V_u = 10.51$ мин; ЭРИ-МС: 705 [M+H]⁺

³¹P ЯМР (162 МГц, D₂O, 303 К): δ 54.5 (s, 1P), 55.0 (s, 1P) част. на млн.

Получение Примера 1.2, натриевая соль («первый элюированный диастереомер»)

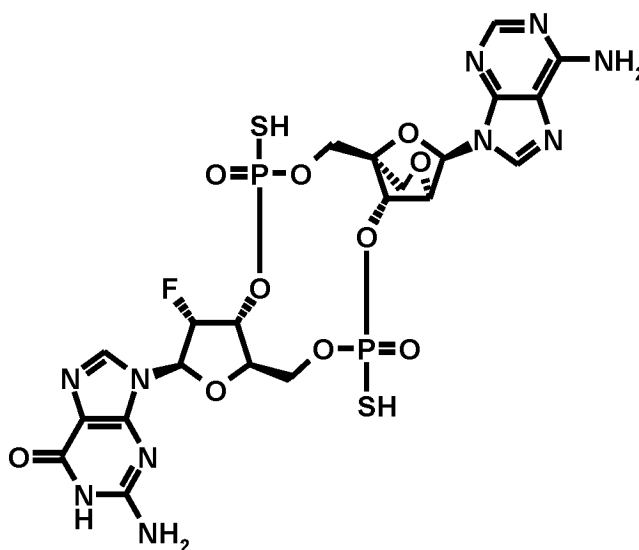
Обессоливание и замену соли с триэтиламмония на натрий Примера 1.2, соль ТЕА, осуществляли подобным образом, как описано для Примера 1.1, соль ТЕА.

ВЭЖХ (конфигурация А): $V_u = 9.25$ мин; ЭРИ-МС: 705 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.8 (s, 1P), 55.7 (s, 1P) част. на млн.

Пример 2.1 и Пример 2.2

Циклический (LNA-аденозин-(3'→5')-фосфоротиаат-2'-F-2'-дезоксигуанозин-(3'→5')-фосфоротиаат), натриевая соль



К Промежуточному соединению 2.3 (1300 мг, максимальное теоретическое количество: 1.37 ммоль) добавляли 33% раствор метиламина в этаноле (50 мл) и смесь перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Летучие компоненты удаляли *в вакууме*. Остаток растирали с ацетонитрилом, фильтровали, промывали с ацетонитрилом и сушили *в вакууме*. Остаток очищали с помощью преп. ВЭЖХ (Atlantis C18; 20 мм водн. NH_4OAc / ацетонитрил = 98/2 → 70/30). Содержащие чистый продукт фракции объединяли и лиофилизировали. Таким способом были получены два диастереомера, которые затем очищали с помощью преп. ВЭЖХ (Bonus; 20 мм формиата водн. триэтиламмония) / ацетонитрил = 98/2 → 70/30). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и лиофилизировали два раза. Триэтиламмониевые соли двух диастереомеров были преобразованы в соответствующие натриевые соли, соответственно, путем растворения в 1 мл воды, проходящей через колонку Bio-

Rad Spin (заполненную 250 мг ВТ AG 50W-2 смолы водородной формы 100-200 меш, кондиционированную посредством 3 мл 1М водн. NaOH и после этого промытую нейтральной водой), элюируя водой и лиофилизируя фракции, содержащие продукт.

5 Пример 2.1 («второй элюированный диастереомер»):

ЖХ-МС (Z035_001): Ву = 10.73 мин; ЭРИ-МС: 721 [M+H]⁺

ЖХ-МС (Z018_S04): Ву = 0.60 мин; ЭРИ-МС: 721 [M+H]⁺

³¹P ЯМР (162 МГц, D₂O, 303 К): δ 54.7 (s, 2P) част. на млн.

ПРИМЕР 2.2 («первый элюированный диастереомер»):

10 ЖХ-МС (Z035_001): Ву = 9.09 мин; ЭРИ-МС: 721 [M+H]⁺

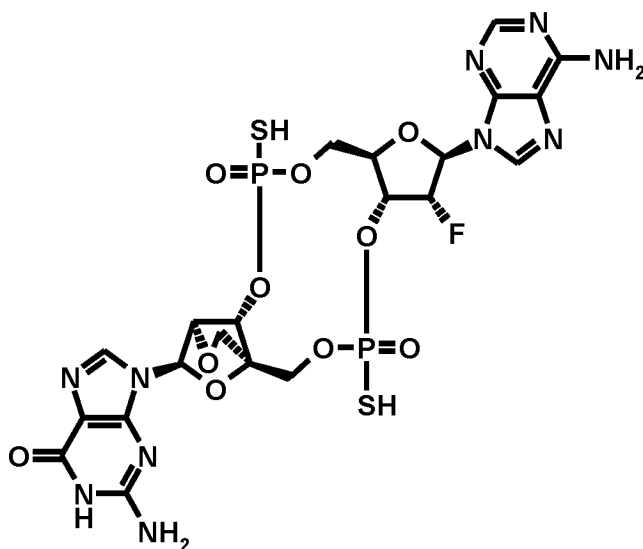
ЖХ-МС (Z018_S04): Ву = 0.39 мин; ЭРИ-МС: 721 [M+H]⁺

³¹P ЯМР (162 МГц, D₂O, 303 К): δ 54.7 (s, 1P); 55.0 (s, 1P) част. на млн.

Пример 3.1, Пример 3.2, Пример 3.3 и Пример 3.4

Циклический (LNA-гуанозин-(3'→5')-фосфоротиоат-2'-F-2'-

15 деоксиаденозин-(3'→5')-фосфоротиоат), натриевая соль



К Промежуточному соединению 3.2 (330 мг, максимальное теоретическое количество: 0.35 ммоль) добавляли 33% раствор метиламина в этаноле (16 мл) и смесь перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре. Летучие компоненты удаляли *в вакууме*. Остаток растирали с ацетонитрилом, фильтровали, промывали с ацетонитрилом и сушили *в вакууме*. Остаток очищали с помощью преп. ВЭЖХ (Atlantis C18; 20 мм водн. NH₄OAc / ацетонитрил, Градиент 98/2 → 80/20). Содержащие чистый продукт фракции объединяли и

лиофилизировали. Таким способом могут быть выделены четыре диастереомера. Триэтиламмониевые соли четырех диастереомеров были преобразованы в соответствующие натриевые соли, соответственно, путем растворения в 1 мл воды, проходящей через колонку Bio-Rad Spin (заполненную 250 мг BT AG 50W-
5 2 смолы водородной формы 100-200 меш, кондиционированную посредством 1M водн. NaOH и после этого промытую нейтральной водой), элюируя водой и лиофилизируя фракции, содержащие продукт.

Пример 3.1 («четвертый элюированный диастереомер»):

ЖХ-МС (Z018S04): $V_y = 0.60$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

10 ЖХ-МС (Z035_001): $V_y = 11.05$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.4 (s, 1P), 54.7 (s, 1P) част. на млн.

Пример 3.2 («третий элюированный диастереомер»):

ЖХ-МС (Z018S04): $V_y = 0.42$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

ЖХ-МС (Z035_001): $V_y = 9.62$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

15 ^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.4 (s, 2P) част. на млн.

Пример 3.3 («второй элюированный диастереомер»):

ЖХ-МС (Z018S04): $V_y = 0.26$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

ЖХ-МС (Z035_001): $V_y = 8.76$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.8 (s, 1P), 55.9 (s, 1P) част. на млн.

20 Пример 3.4 («первый элюированный диастереомер»):

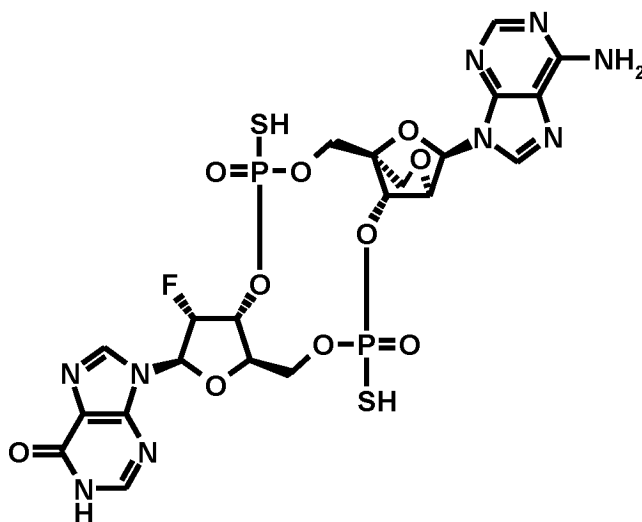
ЖХ-МС (Z018S04): $V_y = 0.16$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

ЖХ-МС (Z035_001): $V_y = 8.06$ мин; ЭРИ-МС: 721 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.8 (s, 1P), 56.0 (s, 1P) част. на млн.

Пример 4.1 и Пример 4.2

Циклический (LNA-аденозин-(3'→5')-фосфоротиаат-2'-F-2'-деоксиинозин-(3'→5')-фосфоротиаат), натриевая соль



5

250 мл 33% метиламина в абсолютном этаноле добавляли к неочищенному Промежуточному соединению 4.2 (0.43 г) и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. Все летучие компоненты выпаривали под сниженным давлением, и остаток дополнительно сушили в вакууме с получением неочищенной сырой смеси, содержащей Пример 4.1 и Пример 4.2. Добавляли 250 мл воды и полученную суспензию помещали в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Через 15 минут, эту суспензию выливали в 125 мл хлороформа и органическую фазу отделяли. Эту экстракцию повторяли еще два раза с хлороформом (2 x 125 мл). Объединенные органические фазы экстрагировали посредством 150 мл воды и объединенную водную фазу, содержащую продукт, фильтровали с помощью 0,45 мкм регенерированного целлюлозного (RC) фильтра (Sartorius Stedim Biotech, внешний диаметр: 50 мм) для удаления компонентов в виде частиц. Раствор продукта разбавляли водой до 1100 мл и наносили на анионообменную колонку Q Sepharose™ Fast Flow (40 – 165 мкм; 125 x 35 мм; ~120 мл) Cl⁻-форма, предварительно регенерированную посредством 2 М хлорида натрия и промывали водой. Колонку промывали водой (2 объема колонки), с последующим градиентом 0 - 1 М буфера бикарбоната триэтиламония (TEAB, pH 7) в воде на 16,7 объемах колонки, с последующим 1 М TEAB, pH 7 на 4.2 объемах колонки (длина волны детектирования 254 нм). Пример 4.1 и Пример

10

15

20

25

4.2 элюировали посредством ~ 0.4 М TEAB - ~ 0.8 М TEAB. Содержащие продукт фракции осторожно концентрировали под сниженным давлением.

Разделение Примера 4.1 (второе элюирование) и Примера 4.2 (первое элюирование) осуществляли с помощью препаративной жидкостной хроматографии среднего давления с обращенной фазой (MPLC). Раствор продукта (~65 мл) наносили на колонку Merck LiChroprep®RP-18 (15 - 25 мкм; 435 x 25 мм; ~215 мл), предварительно уравновешенную посредством 100 мм формиата триэтиламония (TEAF) в воде. Элюирование осуществляли посредством ступенчатого градиента 2%, 3% и 4% 2-пропанола, 20 мм TEAF (pH 6.8) в воде. Содержащие продукт фракции осторожно концентрировали под сниженным давлением.

Дальнейшие очистки Примера 4.1 и Примера 4.2 осуществляли путем повторных полупрепаративных очисток с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Растворы продуктов наносили на колонку YMC*GEL ODS-A 12 нм (10 мкм; 250 x 16 мм; ~50 мл), предварительно уравновешенную посредством 9 - 12% ацетонитрила, 20 мм TEAF (pH 6.8) в воде. Элюирование осуществляли посредством ступенчатого градиента 9% и 12% ацетонитрилом, 20 мм TEAF (pH 6.8) в воде (ПРИМЕР 4.2) или с 12% ацетонитрилом, 20 мм TEAF (pH 6.8) в воде (ПРИМЕР 4.1). Содержащие продукт фракции осторожно концентрировали под сниженным давлением.

Получение Примера 4.1, натриевая соль («второй элюированный диастереомер»)

Обессоливание Примера 4.1, соль TEA, осуществляли с помощью препаративной жидкостной хроматографии среднего давления с обращенной фазой (MPLC). Раствор продукта (~15 мл) наносили на колонку Merck LiChroprep®RP-18 (15 – 25 мкм; 450 x 25 мм; ~220 мл), предварительно уравновешенную водой. Колонку промывали водой для удаления избытка буфера TEAF. После этого, 2% 2-пропанола в воде применяли для элюирования обессоленного Примера 2.1. Содержащие продукт фракции частично концентрировали под сниженным давлением и затем наносили на катионообменную колонку SP Sepharose™ Fast Flow (45 – 165 мкм; 125 x 35 мм; ~120 мл) Na⁺-форма, предварительно регенерированную посредством 2 М хлорида натрия и промывали водой. Колонку промывали водой до тех пор, пока больше не было обнаружено УФ поглощения (длина волны детектирования 254

нм). Содержащие продукт фракции осторожно выпаривали под сниженным давлением и дополнительно сушили *в вакууме* с получением Примера 4.1 в виде натриевой соли.

5 ВЭЖХ (конфигурация А, УФ 250 нм): $V_u = 10.43$ мин; ЭРИ-МС: 706 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.4 (s, 1P), 54.9 (s, 1P) част. на млн.

Получение Примера 4.2, натриевая соль («первый элюированный диастереомер»)

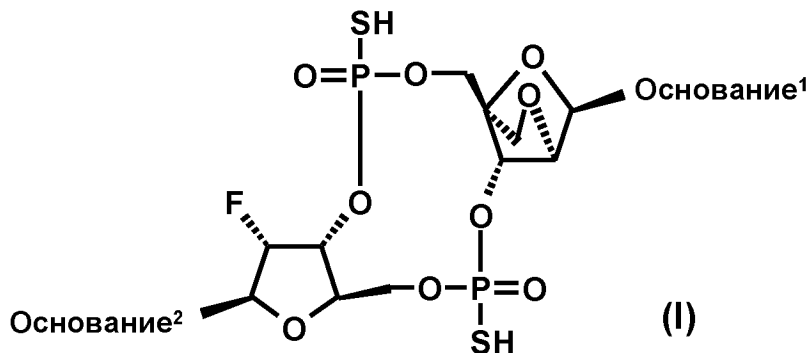
10 Обессоливание и замену соли с ТЕА на натрий Примера 4.2, соль ТЕА осуществляли подобным образом, как описано для Примера, 4.1, соль ТЕА.

ВЭЖХ (конфигурация А, УФ 250 нм): $V_u = 9.37$ мин; ЭРИ-МС: 706 $[M+H]^+$

^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O , 303 К): δ 54.4 (s, 1P), 54.9 (s, 1P) част. на млн.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



в которой

Основание¹ и Основание² независимо выбраны из группы, включающей пурин, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин, связанные через их атомы азота N⁹,

или его соль.

2. Соединение по п. 1, в котором Основание¹ и Основание² представляют собой аденин.

3. Соединение по п. 1, в котором Основание¹ представляет собой аденин, а Основание² представляет собой гуанин.

4. Соединение по п. 1, в котором Основание¹ представляет собой гуанин, а Основание² представляет собой аденин.

5. Соединение по п. 1, в котором Основание¹ представляет собой аденин, а Основание² представляет собой гипоксантин.

6. По существу чистый (Sp,Sp), (Rp,Rp), (Sp,Rp) или (Rp,Sp) стереоизомер соединения по одному или нескольким пп. 1 - 5 или его соль.

7. Фармацевтически приемлемая соль соединения по одному или нескольким пп. 1 - 6.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая одно или большее количество соединений по одному или нескольким пп. 1 - 7, или их фармацевтически приемлемые соли, по выбору вместе с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

9. Вакцина, содержащая соединение по одному или нескольким пп. 1 - 7.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая одно или большее количество соединений по одному или нескольким пп. 1 - 7, или их фармацевтически приемлемые соли, и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств, по выбору совместно с одним или большим количеством инертных носителей и/или разбавителей.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, содержащая одно соединение по одному или нескольким пп. 1 - 7 и одно или большее количество дополнительных терапевтических средств.

12. Соединение по одному или нескольким пп. 1 - 7 для применения в качестве лекарственного средства.

13. Применение соединения по одному или нескольким пп. 1 - 7 в качестве адъюванта для вакцины.

14. Способ лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных посредством STING, в особенности для лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака у нуждающегося в этом пациента, причем способ отличается тем, что одно или большее количество соединений по одному или нескольким пп. 1 - 7 вводят пациенту.

15. Соединение по одному или нескольким пп. 1 - 7 для применения в способе лечения заболеваний или состояний, связанных с или модулированных

посредством STING, в особенности для лечения воспаления, аллергических или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или рака, причем способ отличается тем, что одно или большее количество соединений по одному или нескольким пп. 1 - 7 вводят пациенту.