(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090424 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.26

(22) Дата подачи заявки
2018.08.07

(51) Int. Cl. ***A61K 31/437*** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ

(31) **62/541,807**
(32) **2017.08.07**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/045528**
(87) **WO 2019/032528 2019.02.14**

(71) Заявитель:
РОДИН ТЕРАПЕУТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фуллер Нейтан Оливер, Лове Джон А. III (US)

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

(57) В настоящем изобретении предложены соединения, их фармацевтически приемлемые соли и их фармацевтические композиции, которые являются пригодными для лечения состояний, связанных с ингибированием HDAC (например, HDAC2).

202090424 A1

202090424 A1

БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/541807, поданной 7 августа 2017 г., содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ФИНАНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЯХ И РАЗРАБОТКАХ

[0002] Настоящее изобретение реализовано при государственной поддержке в рамках гранта № 1R43AG048651-01A1 программы поддержки малого бизнеса в области инновационных исследований (SBIR), присужденного Национальным институтом здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Было показано, что ингибиторы гистондеацетилаз (HDAC) модулируют транскрипцию и вызывают остановку роста клеток, дифференцировку и апоптоз. Ингибиторы HDAC также усиливают цитотоксическое действие терапевтических агентов, применяемых для лечения рака, включая радиационные и химиотерапевтические лекарственные средства. Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W. K. Histone deacetylase and cancer: causes and therapies. Nat Rev Cancer, 1, 194-202, (2001); и Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T., Kelly, W. K. Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res, 91, 137-168, (2004). Кроме того, последние данные указывают на то, что дисрегуляция транскрипции может способствовать молекулярному патогенезу определенных нейродегенеративных расстройств, таких как Болезнь Хантингтона, спинальная мышечная атрофия, боковой амиотрофический склероз и ишемия. Langley, B., Gensert, J. M., Beal, M. F., Ratan, R. R. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 4, 41-50, (2005). Недавний обзор суммировал доказательства того, что аберрантная активность гистонацетилтрансферазы (HAT) и гистондеацетилаз (HDAC) может представлять общий основной механизм, способствующий нейродегенерации. Кроме того, путем использования модели депрессии на мышах Нестлер (Nestler) недавно выявил терапевтический потенциал ингибиторов деацетилирования гистонов (HDAC5) при депрессии. Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., Nestler, E. J.

Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nat Neurosci, 9, 519-525, (2006).

[0004] Известно 18 гистондеацетилаз человека, сгруппированных в четыре класса на основе структуры их вспомогательных доменов. Класс I включает HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC8 и имеет гомологию с дрожжевым RPD3. HDAC4, HDAC5, HDAC7 и HDAC9 относятся к классу IIa и имеют гомологию с дрожжами. HDAC6 и HDAC10 содержат два каталитических центра и классифицируются как класс IIb. Класс III (сиртуины) включает SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 и SIRT7. HDAC11 является еще одним недавно идентифицированным членом семейства HDAC и содержит консервативные остатки в своем каталитическом центре, которые являются общими для ацетилаз класса I и класса II, и иногда помещается в класс IV.

[0005] Напротив, было показано, что HDAC являются мощными отрицательными регуляторами процессов долговременной памяти. Неспецифические ингибиторы HDAC усиливают синаптическую пластичность, а также долговременную память (Levenson *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279:40545-40559; Lattal *et al.*, 2007, Behav Neurosci 121:1125-1131; Vecsey *et al.*, 2007, J. Neurosci 27:6128; Bredy, 2008, Learn Mem 15:460-467; Guan *et al.*, 2009, Nature 459:55-60; Malvaez *et al.*, 2010, Biol. Psychiatry 67:36-43; Roozendaal *et al.*, 2010, J. Neurosci. 30:5037-5046). Например, ингибирование HDAC может преобразовывать процесс запоминания, который не приводит к долговременному запоминанию, в процесс запоминания, который приводит к значительному долговременному запоминанию (Stefanko *et al.*, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:9447-9452). Кроме того, ингибирование HDAC также может формировать долговременную память, которая сохраняется за пределами момента, когда нормальная память перестает справляться. Было показано, что ингибиторы HDAC улучшают когнитивные расстройства в генетических моделях болезни Альцгеймера (Fischer *et al.*, 2007, Nature 447:178-182; Kilgore *et al.*, 2010, Neuropsychopharmacology 35:870-880). Указанные работы показывают, что модулирование памяти посредством ингибирования HDAC обладает значительным терапевтическим потенциалом для многих нарушений памяти и когнитивных расстройств.

[0006] К настоящему времени роль отдельных HDAC в долговременной памяти была исследована в двух недавних исследованиях. Килгор (Kilgore) *et al.* в 2010, Neuropsychopharmacology 35:870-880 выявил, что неспецифические ингибиторы HDAC, такие как бутират натрия, ингибируют HDAC класса I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) с небольшим влиянием на членов семейства HDAC класса IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9). Это свидетельствует о том, что ингибирование HDAC класса I может иметь решающее значение для улучшения когнитивных функций, наблюдаемого во многих

исследованиях. Действительно, специфическая повышенная экспрессия HDAC2, но не HDAC1, в переднем мозге и нейронах понижала плотность дендритных шипиков, синаптическую плотность, синаптическую пластичность и формирование памяти (Guan *et al.*, 2009, Nature, 459:55-60). Напротив, мыши с нокаутированным HDAC2 демонстрировали повышенную синаптическую плотность, повышенную синаптическую пластичность и повышенную дендритную плотность в нейронах. Указанные мыши с дефицитом HDAC2 также демонстрировали улучшенную обучаемость и запоминание в ряде обучающих поведенческих парадигм. Указанная работа демонстрирует, что HDAC2 является ключевым регулятором синаптогенеза и синаптической пластичности. Кроме того, Гуань (Guan) *et al.* показал, что длительное лечение мышей при помощи SAHA (ингибитор HDAC 1, 2, 3, 6, 8) воспроизводит эффекты, наблюдаемые у мышей с дефицитом HDAC2, и устраняет когнитивные нарушения у мышей с повышенной экспрессией HDAC2.

[0007] Ингибирование HDAC2 (селективно или в комбинации с ингибированием других HDAC класса I) является привлекательной терапевтической задачей. Такое ингибирование обладает потенциалом для улучшения когнитивных функций и облегчения процесса обучения посредством увеличения синаптической и дендритной плотности в популяциях нейронных клеток. Кроме того, ингибирование HDAC2 также может являться терапевтически полезным при лечении широкого спектра других заболеваний и расстройств.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В настоящем изобретении описаны соединения и их фармацевтически приемлемые соли, а также фармацевтические композиции, которые являются пригодными для лечения состояний, связанных с активностью HDAC (например, HDAC2). См., например, таблицу **1**.

[0009] Одним из преимуществ конкретных соединений, описанных в настоящей заявке, является то, что они обладают улучшенными параметрами безопасности. Например, включение дополнительного атома фтора в нижнее фенильное кольцо конкретных соединений обеспечило почти двукратное повышение безопасности, демонстрирующее меньшее влияние на эритроидные и миелоидные клетки-предшественники человека. См., например, **таблицу 4**, **соединение сравнения 1** по сравнению с **соединением 10**; **соединение сравнения 2** по сравнению с **соединением 3**; **соединение сравнения 5** по сравнению с **соединением 1**; и **соединение сравнения 6** по сравнению с **соединением 2**. Аналогичный результат наблюдался между региоизомерами (сравните **соединение**

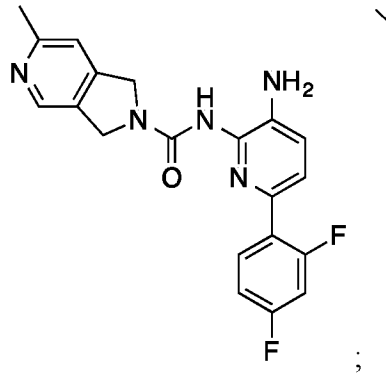
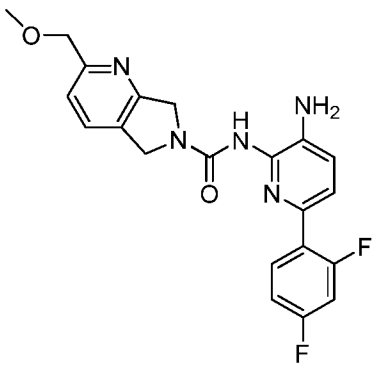
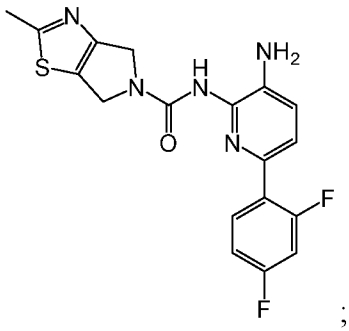
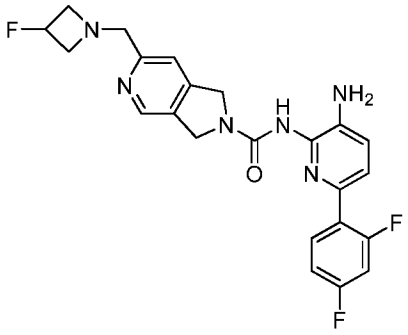
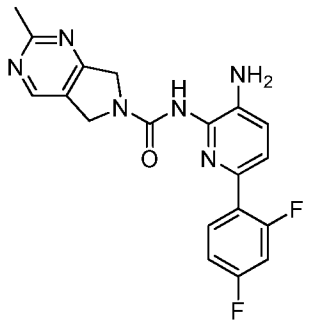
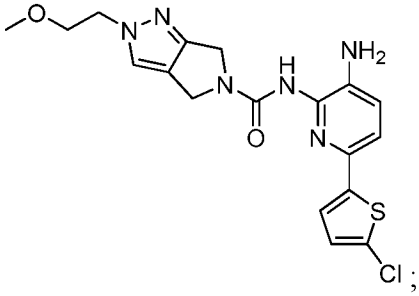
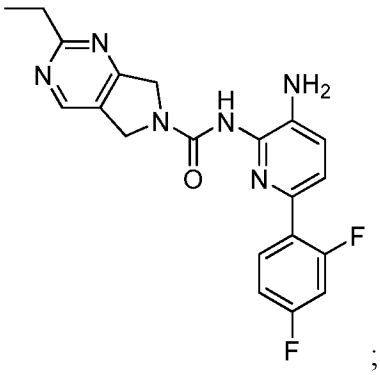
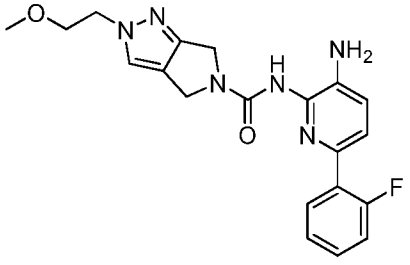
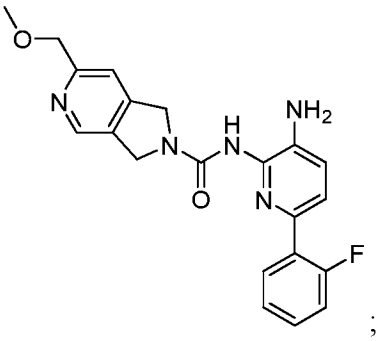
сравнения 4 с **соединением 8**) и при замене атома водорода на фтор (сравните **соединение сравнения 3** с **соединением 6**).

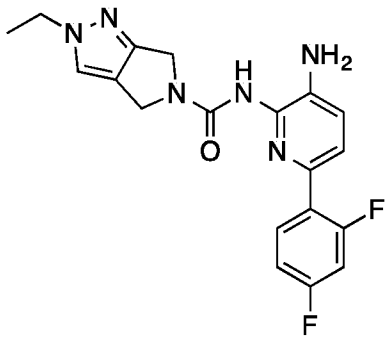
[0010] Состояния, которые поддаются лечению при помощи описанных соединений, включают, но не ограничиваются следующими, неврологические расстройства, расстройства или нарушения памяти или когнитивных функций, расстройства торможения обучаемости, грибковые заболевания или инфекции, воспалительные заболевания, гематологические заболевания, опухолевые заболевания, психические расстройства и потерю памяти.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединения

[0011] В настоящем изобретении предложены соединения, имеющие формулу, выбранную из:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

и  ;

или их фармацевтически приемлемые соли.

[0012] Другие примеры соединений, включенных в настоящее изобретение, представлены в разделе ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ПРИМЕРЫ. Также включены фармацевтически приемлемые соли, а также нейтральные формы указанных соединений.

2. Определения

[0013] Применяемые в настоящей заявке термины “субъект” и “пациент” можно использовать взаимозаменяемо, и они обозначают млекопитающее, нуждающееся в лечении, например, домашних животных (например, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, свиней, лошадей, овец, коз и т.п.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок и т.п.). Как правило, субъектом является человек, нуждающийся в лечении.

[0014] Также включены фармацевтически приемлемые соли, а также нейтральные формы соединений, описанных в настоящей заявке. Подходящие для применения в лекарственных средствах соли соединений относятся к нетоксичным “фармацевтически приемлемым солям”. Фармацевтически приемлемые солевые формы включают фармацевтически приемлемые кислотные/анионные или основные/катионные соли. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают соли натрия, калия, кальция, магния, диэтаноламина, *н*-метил-D-глюкамина, L-лизина, L-аргинина, аммония, этаноламина, пиперазина и триэтаноламина. Фармацевтически приемлемые кислотные/анионные соли включают, например, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, карбонат, цитрат, дигидрохлорид, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, гидробромид, гидрохлорид, малат, малеат, малонат, мезилат, нитрат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат и тозилат.

[0015] Термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к нетоксичному носителю, вспомогательному веществу или веществу-носителю, которое не ухудшает фармакологическую активность соединения, с которым оно образует состав. Фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или вещества-

носители, которые можно применять в композициях, описанных в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, ионообменные соединения, оксид алюминия, стеарат алюминия, летицин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов растительных жирных кислот растительного происхождения, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, динатрия гидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

[0016] Термины “лечение”, “лечить” и “излечение” относятся к обращению, облегчению, снижению вероятности развития или ингибированию прогрессирования заболевания или расстройства или одного или более их симптомов, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации лечение можно назначать после развития одного или более симптомов, т.е. терапевтическое лечение. В других вариантах реализации лечение можно назначать при отсутствии симптомов. Например, лечение можно назначать восприимчивому пациенту, до появления симптомов (например, с учетом истории симптомов и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости), т.е. профилактическое лечение. Лечение также можно продолжать после устранения симптомов, например, для предотвращения или задержки их повторного появления.

[0017] Термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” включает количество соединения, описанного в настоящей заявке, которое вызывает биологический или медицинский ответ у субъекта, например, от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/сутки предложенного соединения, такое как, например, от 0,1 до 100 мг/кг массы тела/сутки.

3. Применения, получение состава и введение

[0018] В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, подходят для лечения состояний, связанных с активностью HDAC. Такие состояния включают, например, состояния, описанные ниже.

[0019] В недавних сообщениях подробно описана важность ацетилирования гистонов для функций центральной нервной системы (“ЦНС), таких как дифференцировка нейронов, формирование памяти, привыкание к лекарственным средствам и дипрессия (Citrome, Psychopharmacol. Bull. 2003, 37, Suppl. 2, 74-88; Johannessen, CNS Drug Rev. 2003, 9, 199-216; Tsankova *et al.*, 2006, Nat. Neurosci. 9, 519-525). Таким образом, в одном аспекте предложенные соединения и композиции могут являться полезными при лечении

неврологических расстройств. Примеры неврологических расстройств включают: (i) хронические нейродегенеративные заболевания, такие как семейный и спорадический боковой амиотрофический склероз (СБАС и БАС, соответственно), семейная и спорадическая болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, семейная и спорадическая болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, мышечная дистрофия, оливопонтоцеребеллярная атрофия, множественная системная атрофия, болезнь Вильсона, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь диффузных телец Леви, кортикодентатонигральная дегенерация, прогрессирующая семейная миоклоническая эпилепсия, стрионигральная дегенерация, торсионная дистония, семейный тремор, синдром Дауна, синдром Жиля де ла Туретта, болезнь Галлервордена-Шпатца, диабетическая периферическая нейропатия, деменция пугилистика, СПИД-деменция, возрастная деменция, возрастное нарушение памяти и нейродегенеративные заболевания, опосредованные амилоидозом, такие как заболевания, вызываемые прионным белком (PrP), который связан с трансмиссивной губчатообразной энцефалопатией (болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, почесуха и куру), и заболевания, вызываемые избыточным накоплением цистатина С (наследственная цистатин С ангиопатия); и (ii) острые нейродегенеративные расстройства, такие как травматическое повреждение мозга (например, повреждение мозга, связанное с хирургическим вмешательством), отек головного мозга, повреждение периферических нервов, повреждение спинного мозга, болезнь Лея, синдром Гийена-Барре, лизосомные болезни накопления, такие как липофусциноз, болезнь Альперса, синдром беспокойных ног, вертиго в результате дегенерации ЦНС; патологии, возникающие при хроническом алгоколизме или злоупотреблении лекарственными средствами, включая, например, дегенерацию нейронов в голубом пятне и мозжечке, вызываемые лекарственными средствами расстройства движения; патологии, возникающие при старении, включая дегенерацию мозжечковых нейронов и кортикальных нейронов, приводящую к нарушениям когнитивных и двигательных функций; и патологии, возникающие при хроническом злоупотреблении амфетамином, включая дегенерацию нейронов базальных ганглиев, приводящую к нарушениям двигательных функций; патологические изменения в результате фокальной травмы, такие как инсульт, фокальная ишемия, сосудистая недостаточность, гипоксически-ишемическая энцефалопатия, гипергликемия, гипогликемия или прямая травма; патологии, возникающие как отрицательный побочный эффект терапевтических лекарственных средств и способов лечения (например, дегенерация нейронов передней поясной и энторинальной коры в ответ на противосудорожные дозы антагонистов глутаматного репецтора класса NMDA), и

деменция, опосредованная синдромом Вернике-Корсакова. Неврологические расстройства, затрагивающие сенсорные нейроны, включают атаксию Фридрейха, диабеты, периферическую нейропатию и дегенерацию нейронов сетчатки. Другие неврологические расстройства включают повреждение нерва или травму, связанную с повреждением спинного мозга. Неврологические расстройства лимбической и кортикальной систем включают церебральный амилоидоз, атрофию Пика и синдром Ретта. В другом аспекте неврологические расстройства включают расстройства настроения, такие как аффективные растройства и беспокойство; расстройства социального поведения, такие как дефекты характера и личностные расстройства; расстройства обучаемости, расстройства памяти и интеллекта, такие как умственная отсталость и деменция. Таким образом, в одном аспекте описанные соединения и композиции могут являться полезными при лечении шизофрении, делирия, расстройства дефицита внимания (РДВ), шизоаффективного расстройства, болезни Альцгеймера, синдрома Рубинштейна-Тейби, депрессии, мании, расстройств дефицита внимания, привыкания к лекарственным средствам, деменции, возбужденного состояния, апатии, беспокойства, психозов, расстройств личности, биполярных расстройств, униполярного аффективного расстройства, обсессивно-компульсивных расстройств, расстройств пищевого поведения, посттравматических стрессовых расстройств, раздражительности, подросткового кондуктивного расстройства и расторможенности.

[0020] Транскрипцию считают ключевой стадией для процессов долговременной памяти (Alberini, 2009, Physiol. Rev. 89, 121-145). Транскрипция стимулируется специфическими модификациями хроматина, такими как ацетилирование гистонов, которые модулируют взаимодействия гистон-ДНК (Kouzarides, 2007, Cell, 128:693-705). Модифицирующие ферменты, такие как гистонацетилтрансферазы (HAT) и гистондеацетилазы (HDAC), регулируют состояние ацетилирования на концах гистонов. В целом, ацетилирование гистонов способствует экспрессии генов, тогда как деацетилирование гистонов приводит к подавлению экспрессии генов. Многочисленные исследования показали, что высокоактивный белок (CBP), связывающий HAT, цАМФ-элемент-связывающий белок (CREB), необходим для долговременных форм синаптической пластичности и долговременной памяти (в целях знакомства см. Barrett, 2008, Learn Mem 15:460-467). Таким образом, в одном аспекте предложенные соединения и композиции могут являться полезными для улучшения когнитивной функции и улучшения обучаемости и формирования памяти.

[0021] Соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, также можно применять для лечения грибковых заболеваний или инфекций.

[0022] В другом аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, можно применять для лечения воспалительных заболеваний, таких как инсульт, ревматоидный артрит, красная волчанка, язвенный колит и травматические повреждения мозга (Leoni *et al.*, PNAS, 99(5); 2995-3000(2002); Suuronen *et al.* J. Neurochem. 87; 407-416 (2003) и Drug Discovery Today, 10: 197-204 (2005).

[0023] В другом аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, можно применять для лечения рака, вызванного пролиферацией опухолевых клеток. Такие раки включают, например, солидные опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкозы, лимфомы и т.п. В одном аспекте раки, которые можно лечить соединениями и композициями, описанными в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими: рак сердца, рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочеполового тракта, рак печени, рак нервной системы, гинекологический рак, гематологический рак, рак кожи и рак надпочечников. В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении раков сердца, выбранных из саркомы (ангиосаркомы, фибросаркомы, рабдомиосаркомы, липосаркомы), миксомы, рабдомиомы, фибромы, липомы и тератомы. В другом аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака легких, выбранного из бронхогенной карциномы (плоскоклеточной, недифференцированной мелкоклеточной, недифференцированной крупноклеточной, аденокарциномы), альвеолярной (бронхиолярной) карциномы, бронхиальной аденомы, саркомы, лимфомы, хондроматозной гамартомы и мезотелиомы. В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака желудочно-кишечного тракта, выбранного из рака пищевода (плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома, лейомиосаркома, лимфома), желудка (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), поджелудочной железы (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкой кишки (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма) и толстой кишки (аденокарцинома, тубулярная аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома). В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака мочеполового тракта, выбранного из рака почки (аденокарцинома, опухоль Вильма [нефробластома], лимфома, лейкоз), мочевого пузыря и уретры (плоскоклеточная карцинома, переходно-клеточная карцинома, аденокарцинома), простаты (аденокарцинома, саркома) и семенника (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома, хориокарцинома, саркома, карцинома из интерстициальных клеток, фиброма, фиброаденома, аденоматоидные опухоли, липома). В

одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака печени, выбранного из гепатомы (гепатоцеллюлярной карциномы), холангиокарциномы, гепатобластомы, ангиосаркомы, гепатоцеллюлярной аденомы и гемангиомы.

[0024] В некоторых вариантах реализации соединения, описанные в настоящей заявке, относятся к лечению рака кости, выбранного из остеогенной саркомы (остеосаркомы), фибросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, хондросаркомы, саркомы Юинга, злокачественной лимфомы (ретикулоклеточной саркомы), множественной миеломы, злокачественной гигантоклеточной опухоли, хордомы, остеохондромы (костно-хрящевых экзостоз), доброкачественной хондромы, хондробластомы, хондромиксофибромы, остеоидной остеомы и гигантоклеточных опухолей.

[0025] В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака нервной системы, выбранного из рака черепа (остеома, гемангиома, гранулома, ксантома, деформирующий остит), мягких мозговых оболочек (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), головного мозга (астроцитома, медуллобластома, глиома, эпендимома, герминома [пинеалома], мультиформная глиобластома, олигодендроглиома, шваннома, ретинобластома, врожденные опухоли) и спинного мозна (нейрофиброма, менингиома, глиома, саркома).

[0026] В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении гинекологического рака, выбранного из рака матки (эндометриальная карцинома), шейки матки (карцинома шейки матки, предопухолевая цервикальная дисплазия), яичников (карцинома яичника [серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома, неклассифицированная карцинома], гранулезотекаклеточные опухоли, опухоль из клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминома, злокачественная тератома), вульвы (плоскоклеточная карцинома, внутриэпителиальная карцинома, аденокарцинома, фибросаркома, меланома), влагалища (светлоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ботриоидная саркома, эмбриональная рабдомиосаркома) и фаллопиевых труб (карцинома).

[0027] В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака кожи, выбранного из злокачественной меланомы, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, саркомы Капоши, диспластические невоидные опухоли, липомы, ангиомы, дерматофибромы, келоидов и псориаза.

[0028] В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении рака надпочечников, выбранного из нейробластомы.

[0029] В одном аспекте соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, являются полезными при лечении раков, которые включают, но не ограничиваются ими: лейкозы, включая острые лейкозы и хронические лейкозы, такие как острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз (CML) и лейкоз ворсистых клеток; лимфомы, такие как кожные Т-клеточные лимфомы (CTCL), некожные периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы, связанные с человеческим Т-клеточным лимфотрофическим вирусом (HTLV), такие как Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых (ATLL), болезнь Ходжкина и неходжкинские лимфомы, крупноклеточные лимфомы, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL); лимфома Беркитта; мезотелиома, первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС); множественная миелома; солидные опухоли детского возраста, такие как опухоли головного мозга, нейробластома, ретинобластома, опухоль Вильма, накостные опухоли, и саркомы мягких тканей, распространенные солидные опухоли у взрослых, такие как раки головы и шеи (например, рак полости рта, гортани и пищевода), раки мочеполового тракта (например, рак простаты, мочевого пузыря, почки, матки, яичников, яичка, прямой кишки и толстой кишки), рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, меланому и другие раки кожи, рак желудка, опухоли головного мозга, рак печени и рак щитовидной железы.

[0030] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения состояния, описанного в настоящей заявке, включающий введение субъекту эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, описанной в настоящей заявке, или их композиции.

[0031] Также предложено одно или более соединений или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящей заявке, или предложенная композиция для лечения состояния, описанного в настоящей заявке.

[0032] Также предложено применение одного или более соединений, или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящей заявке, для производства лекарственного средства для лечения состояния, описанного в настоящей заявке.

[0033] Также можно выбирать субъекты, страдающие от одного или более описанных состояний перед началом лечения одним или более описанными соединениями, или их фармацевтически приемлемыми солями, или предложенными композициями.

[0034] В настоящем изобретении также предложены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие соединение, описанное в настоящей заявке, или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель. Указанные композиции можно применять для лечения одного или более состояний, описанных выше.

[0035] Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить перорально, парентерально, при помощи аэрозоля для ингаляций, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин “парентеральный”, применяемый в настоящей заявке, включает подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставный, внутрисиновиальный, внутригрудинный, интратекальный, внутрипеченочный, внутриочаговый и внутричерепной способы инъекции или инфузии. В настоящую заявку включены жидкие лекарственные формы, инъекционные препараты, формы твердой дисперсии и лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения.

[0036] Следует понимать, что конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента зависят от множества факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, режим питания, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, оценку лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Количество предложенного соединения в композиции также зависит от конкретного соединения в композиции.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ПРИМЕРЫ

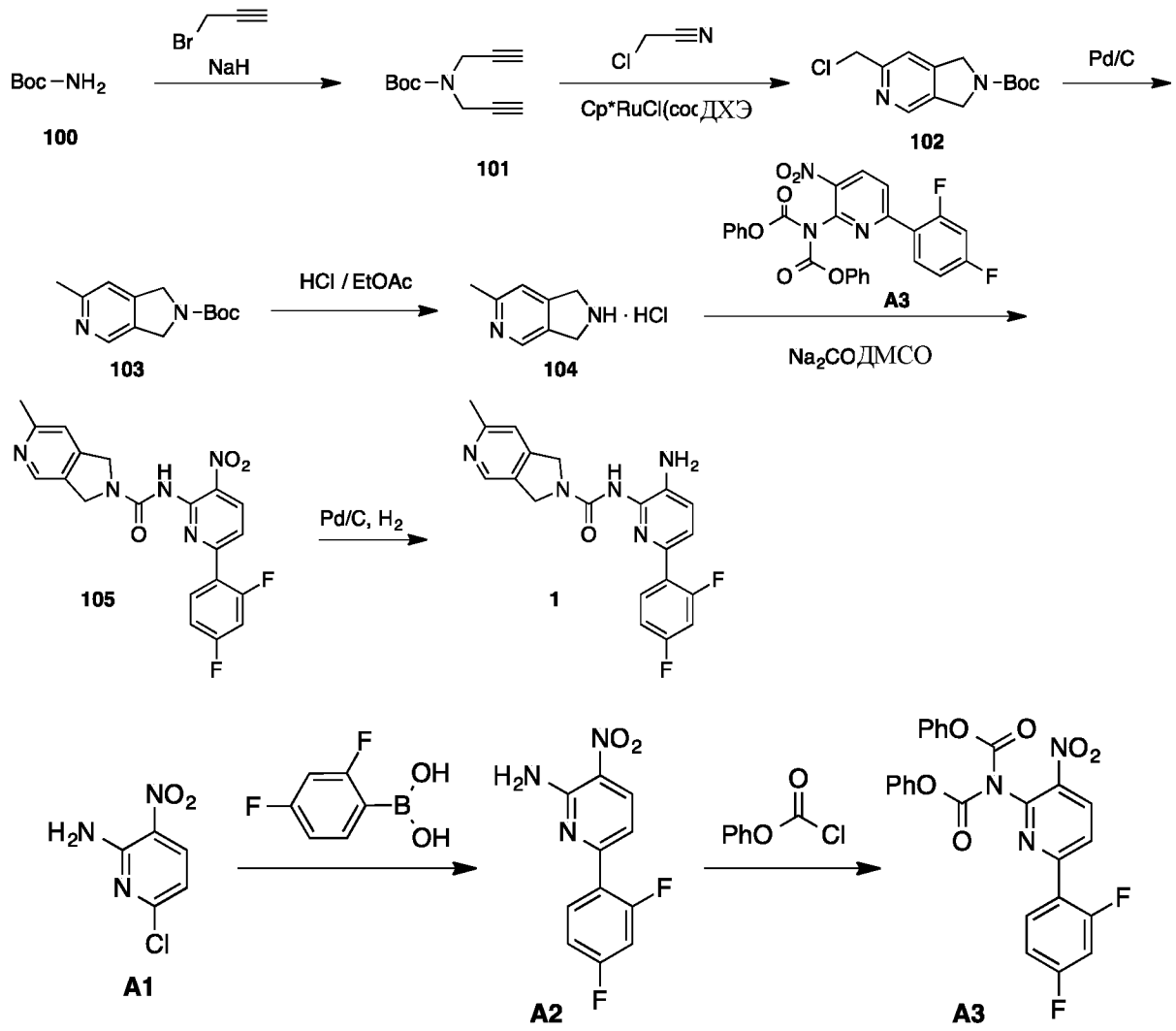
Общая информация

[0037] Пятна визуализировали УФ-светом (254 и 365 нм). Очистку путем колоночной хроматографии и флэш-хроматографии осуществляли с применением силикагеля (200-300 меш). Системы растворителей приведены в виде отношения растворителей.

[0038] Спектры ^{1}H-ЯМР записывали на Bruker Avance III 400 MHz или Bruker Fourier 300 MHz. Химические сдвиги ^{1}H приведены в значениях δ в ppm с тетраметилсиланом (ТМС = 0,00 ppm) в качестве внутреннего стандарта. См., например, данные, представленные в **таблице 1**.

[0039] Спектры ЖХМС получали на масс-спектрометре Agilent 1200 серий 6110 или 6120 с режимом ионизации ИЭР (+) (колонка: C18 (50 × 4,6 мм, 5 мкм), функционирующий в режиме ионизации ЭР (+) или (-); T = 30°C; скорость потока = 1,5 мл/мин; детектируемая длина волны: 220 нм). См., например, данные, представленные в **таблице 1**.

Пример 1. Получение соединения 1



[0040] ***Получение промежуточного соединения 101***. К раствору **промежуточного соединения 100** (350 г, 3,00 моль) в ДМФА (5500 мл) при 0°C добавляли NaH (360 г, 9,00 моль) и смесь перемешивали в течение 30 мин при указанной температуре. Добавляли раствор пропаргилбромида (1,43 кг, 12,0 моль) в ДМФА (1500 мл), реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 4 ч. Затем реакцию гасили насыщенным раствором хлорида аммония и смесь экстрагировали EtOAc (2000 мл x 3). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором NaCl (2000 мл x 2), сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии с применением силикагеля с получением **промежуточного соединения 101** (245 г, 42,5%) в виде желтой маслянистой жидкости. ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ (ppm) 1,48 (s, 9H), 2,22 (t, 2H, J = 4,8 Гц), 4,17 (s, 4H).

[0041] ***Получение промежуточного соединения 102***. К раствору **промежуточного соединения 101** (270 г, 1,40 моль) и Cp*RuCl(cod) (13,5 г, 35,6 ммоль) в сухом дегазированном 1,2-дихлорэтане (2200 мл) добавляли раствор хлорацетонитрила (157 г,

2,10 моль) в сухом дегазированном 1,2-дихлорэтане (500 мл) в течение 15 мин в атмосфере Ar при комнатной температуре. Затем реакционную смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 0,5 ч, после чего растворитель выпаривали и неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии с применением силикагеля с получением **промежуточного соединения 102** (210 г, 56,0%) в виде беловатого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ (ppm) 1,52 (s, 9H), 4,67-4,73 (m, 6H), 7,40 (d, 1H, J = 19,2 Гц), 8,50 (d, 1H, J = 15,6 Гц). МС 269,1 $[M + H]^+$.

[0042] ***Получение промежуточного соединения 103***. Раствор **промежуточного соединения 102** (210 г, 784 ммоль) в MeOH (4000 мл) обрабатывали Pd/C (21,0 г) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H_2 в течение 2 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме с получением **промежуточного соединения 103** (120 г, 65,6%) в виде беловатого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ (ppm) 1,53 (s, 9H), 2,98 (s, 3H), 4,86-4,90 (m, 4H), 7,53-7,60 (m, 1H), 8,62-8,67 (m, 1H). МС 235,1 $[M + H]^+$.

[0043] ***Получение промежуточного соединения 104***. 4 н. раствор HCl (600 мл, раствор HCl в EtOAc) по каплям добавляли к раствору **промежуточного соединения 103** (120 г, 513 ммоль) в EtOAc (600 мл) с температурой 0°C. Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч. Растворитель удаляли путем фильтрования с получением **промежуточного соединения 104** в виде белого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6, 400 МГц): δ (ppm) 2,75 (s, 3H), 4,73-4,80 (m, 4H), 7,97 (s, 1H), 8,20 (s, 1H). МС 135,1 $[M + H]^+$.

[0044] ***Получение промежуточного соединения 105***. Смесь **промежуточного соединения 104** (513 ммоль), **промежуточного соединения A3** (151 г, 308 ммоль) и Na_2CO_3 (272 г, 2,57 моль) в ДМСО перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. После завершения реакции, определяемого путем ЖХМС, реакционную смесь погружали в холодную воду и экстрагировали EtOAc, слои разделяли. Затем органический слой концентрировали в вакууме и остаток растирали с EtOAc, а затем фильтровали с получением **промежуточного соединения 105** (80,0 г, 38% от соединения 5) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6, 400 МГц): δ (ppm) 2,49 (s, 3H), 4,70-4,96 (m, 4H), 7,29-7,35 (m, 2H), 7,45-7,49 (m, 1H), 7,50-7,51 (m, 1H), 8,08-8,14 (m, 1H), 8,46 (d, 2H, J = 8,4 Гц), 10,11 (шир., 1H). МС 412,1 $[M + H]^+$.

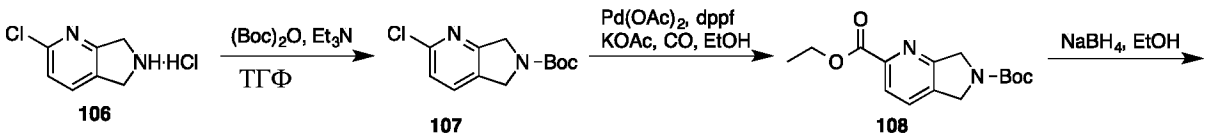
[0045] ***Получение соединения 1***. Смесь **промежуточного соединения 105** (80,0 г, 195 ммоль) и Pd/C (8,00 г) в MeOH (2500 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Через 1 ч Pd/C удаляли путем фильтрования через целит.

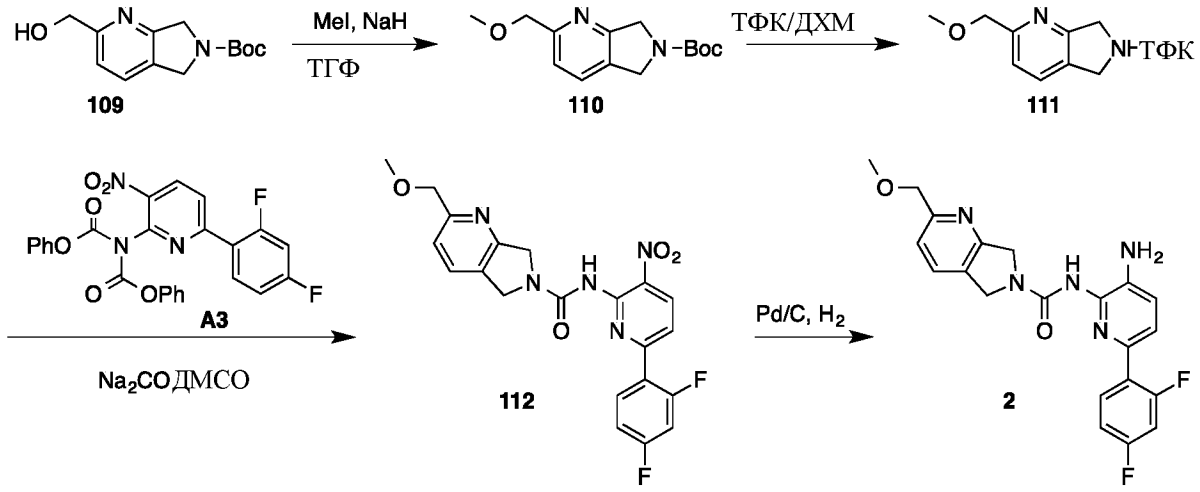
Фильтрат концентрировали и остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле с получением **соединения 1** (52,0 г, 70,3%) в виде серого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6, 400 МГц): δ (ppm) 2,48 (s, 3H), 4,77 (s, 4H), 5,28 (s, 2H), 7,16-7,18 (m, 2H), 7,28-7,31 (m, 2H), 7,40-7,42 (m, 1H), 7,92-7,94 (m, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,56 (s, 1H). МС 382,1 [M + H]$^+$.

[0046] ***Получение промежуточного соединения А2***. Смесь **промежуточного соединения А1** (300 г, 1,73 моль), 4-фторфенилбороновой кислоты (265 г, 1,91 ммоль) и Cs_2CO_3 (1,13 кг, 3,46 моль) в смеси диоксан/H_2O (6000 мл/600 мл) обрабатывали $Pd(PPh_3)_4$ (72,6 г, 86,3 ммоль) в атмосфере N_2. Смесь перемешивали при 95°C в течение 2 ч, а затем концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в EtOAc (4000 мл) и полученный раствор промывали солевым раствором (1000 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, а затем концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле с получением **промежуточного соединения А2** (240 г, неочищенный) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ (ppm) 6,90-6,96 (m, 1H), 6,99-7,04 (m, 1H), 7,23-7,26 (m, 1H), 8,02-8,08 (m, 1H), 8,47 (d, 1H, *J* = 8,4 Гц). МС 252,0 [M + H]$^+$.

[0047] ***Получение промежуточного соединения А3***. Фенилхлорформиат (354 г, 2,27 моль) по каплям добавляли при перемешивании к раствору **промежуточного соединения А2** (240 г, неочищенное) в пиридине (4800 мл) при комнатной температуре. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение ночи. Затем смесь концентрировали в вакууме и неочищенный остаток очищали путем повторной кристаллизации с МТБЭ с получением **промежуточного соединения А3** (240 г, 28,2% от соединения А1) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ (ppm) 6,97-7,02 (m, 1H), 7,08-7,39 (m, 11H), 8,13 (d, 1H, *J* = 8,4 Гц), 8,24-8,30 (m, 1H), 8,67 (d, 1H, *J* = 8,8 Гц). МС 492,1 [M + H]$^+$.

Пример 2. Получение соединения 2





[0048] ***Получение 107.*** Смесь 2-хлор-6,7-дигидро-5H-пирроло[3,4-b]пиридина гидрохлорида (11 г, 57,9 ммоль), ТЭА (17,5 г, 173,7 ммоль) и $(Boc)_2O$ (13,9 г, 63,7 ммоль) в ТГФ (250 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакционную смесь погружали в ДХМ (500 мл), промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:EtOAc = 100:1 ~ 10:1) с получением **107** (13,5 г, 92%) в виде белого твердого вещества. МС 255,2 $[M+H]^+$.

[0049] ***Получение 108***. Смесь **107** (13,5 г, 53,1 ммоль), ацетата калия (10,4 г, 106,2 ммоль), dppf (1,1'-бис (дифенилфосфино) ферроцен) (883 мг, 1,59 ммоль) и ацетата палладия (677 мг, 2,66 ммоль) в этаноле (20 мл) перемешивали при 100°C в течение 16 ч в атмосфере CO при 1,5 МПа. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали в вакууме и остаток растворяли в ДХМ (500 мл), промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 8:1 ~ 3:1) с получением **108** (13,4 г, 86%) в виде белого твердого вещества. МС 292,1 $[M+H]^+$.

[0050] ***Получение 109***. Смесь **108** (13,4 г, 45,9 ммоль) и $NaBH_4$ (10,4 г, 275,3 ммоль) в этаноле (260 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток растворяли в ДХМ (500 мл), промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 20:1) с получением **109** (8,6 г, 75%) в виде белого твердого вещества. МС 251,4 $[M+H]^+$.

[0051] ***Получение 110***. К смеси **109** (8,6 г, 34,4 ммоль) в ДМФА (200 мл) при комнатной температуре добавляли NaH (60% раствор в минеральном масле) (4,1 г, 103,2 ммоль).

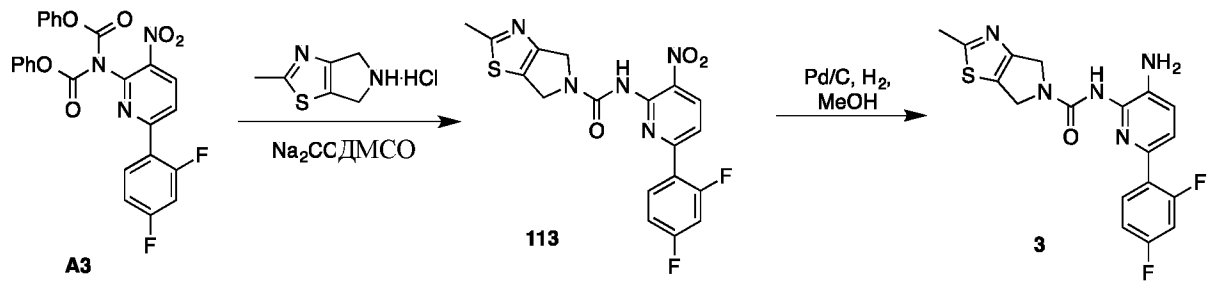
Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего по каплям добавляли MeI (14,6 г, 103,2 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем раствор разбавляли водой (300 мл) и экстрагировали EtOAc (200 мл × 3). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 8:1 ~ 3:1) с получением **110** (8,0 г, 88%) в виде беловатого твердого вещества. МС 265,3 $[M+H]^+$.

[0052] ***Получение 111***. К раствору **110** (7,6 г, 28,8 ммоль) в ДХМ (70 мл) на ледяной бане по каплям добавляли ТФК (38 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего растворитель удаляли в вакууме с получением **111** в виде неочищенного продукта. МС 165,2 $[M+H]^+$.

[0053] ***Получение 112***. Смесь **111** (28,8 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии), **A3** (11,8 г, 24 ммоль) и Na_2CO_3 (25,4 г, 240 ммоль) в ДМСО (200 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции, определяемого путем ЖХМС, раствор разбавляли водой (300 мл), а затем экстрагировали EtOAc (200 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = от 1:1 до EtOAc) с получением **112** (7,0 г, 66%) в виде желтого твердого вещества. МС 442,2 $[M+H]^+$.

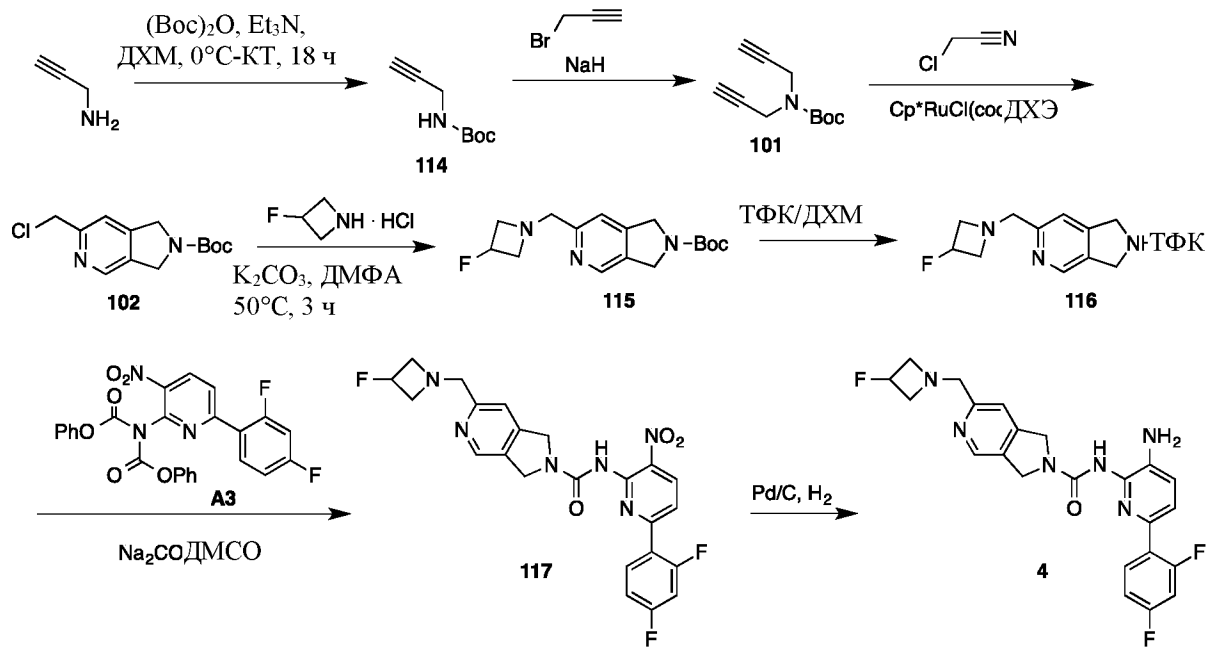
[0054] ***Получение соединения 2***. Смесь **112** (7,0 г, 15,9 ммоль) и Pd/C (2,3 г) в смеси ДХМ/MeOH (140 мл/140 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч в атмосфере H_2. Затем Pd/C удаляли путем фильтрования через целит. Фильтрат концентрировали и остаток повторно кристаллизовывали с МТБЭ с получением **соединения 2** (4,5 г, 69%) в виде светло-желтого твердого вещества. МС 412,1 $[M+H]^+$.

Пример 3. Получение соединения 3



[0055] ***Получение соединения 3***. Соединение **3** получали аналогично способу получения **1** с получением **3** (28 мг, 22%) в виде беловатого твердого вещества. МС 388 $[M+H]^+$.

Пример 4. Получение соединения 4



[0056] ***Получение 114***. К раствору проп-2-ин-1-амина (5,0 г, 90,9 ммоль) и Et_3N (18,4 г, 181,8 ммоль) в ДХМ (100 мл), охлажденному на ледяной бане, по каплям добавляли $(Boc)_2O$ (23,8 г, 109,1 ммоль). После завершения добавления $(Boc)_2O$ полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции смесь разбавляли ДХМ (200 мл), а затем промывали солевым раствором (100 мл × 3). Органический слой сушили над Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 100:1 ~ 10:1) с получением **114** (10 г, 71%) в виде бесцветной маслянистой жидкости. МС 178,3 $[M + 23]^+$, 100,3 $[M – 56]^+$.

[0057] ***Получение 101***. К раствору **114** (10 г, 64,5 ммоль) в ДМФА (200 мл) медленно добавляли NaH (60% раствор в минеральном масле) (2,84 г, 71 ммоль) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем в указанную выше смесь добавляли 3-бромпроп-1-ин (9,2 г, 77,4 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакцию гасили водой (500 мл) и смесь экстрагировали *t*-BuOMe (250 мл × 3). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (200 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали

путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 100:1 ~ 10:1) с получением **101** (12 г, 96%) в виде желтой маслянистой жидкости. МС 138,1 $[M - 56]^+$.

[0058] ***Получение 102***. К раствору 2-хлорацетонитрила (3,13 г, 41,4 ммоль) и [Cp*RuCl(cod)] (394 мг, 1,0 ммоль) в ДХЭ (40 мл) по каплям в течение 30 мин добавляли раствор **101** (4,0 г, 20,7 ммоль) в ДХЭ (80 мл) в атмосфере N_2. Полученную реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 10:1 ~ 2:1) с получением **102** (2,1 г, 22%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества. МС 269,3 $[M + H]^+$.

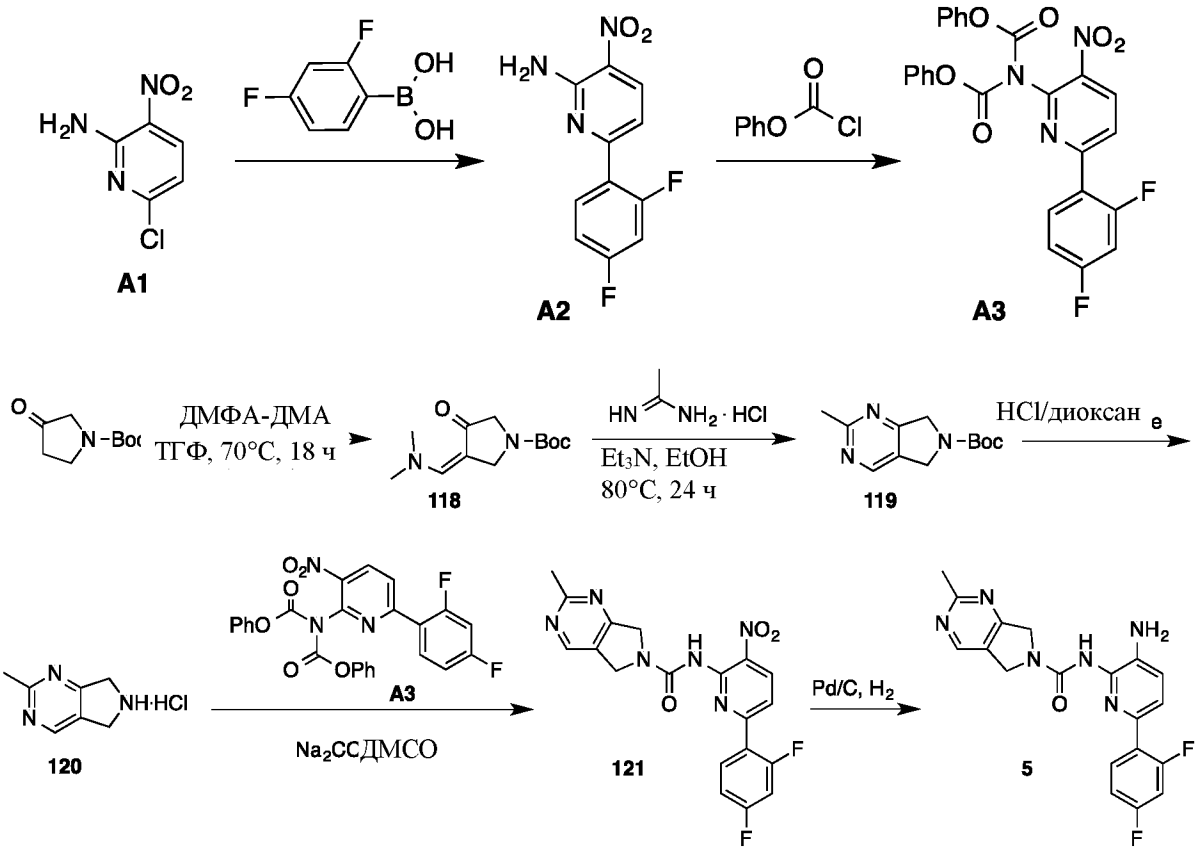
[0059] ***Получение 115***. Смесь **102** (1,50 г, 5,6 ммоль), 3-фторазетидина гидрохлорида (932 мг, 8,4 ммоль) и K_2CO_3 (2,32 г, 16,8 ммоль) в ДМФА (30 мл) перемешивали при 50°C в течение 3 ч. Затем смесь разбавляли водой (60 мл) и экстрагировали EtOAc (30 мл × 4). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 30:1) с получением **115** (1,4 г, 81%) в виде белого твердого вещества. МС 308,2 $[M+H]^+$.

[0060] ***Получение 116***. К раствору **115** (200 мг, 0,65 ммоль) в ДХМ (4 мл) добавляли ТФК (2 мл) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После завершения реакции, определяемого путем ЖХМС, растворитель удаляли в вакууме с получением **116** в виде неочищенного продукта, который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. МС 208,2 $[M+H]^+$.

[0061] ***Получение 117***. Смесь **A3** (265 мг, 0,54 ммоль) и **116** (0,65 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в ДМСО (40 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем добавляли Na_2CO_3 (458 мг, 4,32 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем разбавляли водой (80 мл) и экстрагировали EtOAc (40 мл × 4). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (40 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 50:1) с получением **117** (200 мг, 76%) в виде желтого твердого вещества. МС 485,2 $[M+H]^+$.

[0062] ***Получение соединения 4***. Смесь **117** (200 мг, 0,41 ммоль) и Pd/C (200 мг) в MeOH (8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Pd/C удаляли путем фильтрования через целит и фильтрат концентрировали с получением неочищенного остатка, который три раза очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1) с получением **соединения 4** (26 мг, 14%) в виде желтого твердого вещества.

Пример 5. Получение соединения 5



[0063] ***Получение A2***. Смесь 6-хлор-3-нитропиридин-2-амина (4,58 г, 26,4 ммоль), 2,4-дифторфенилбороновой кислоты (5,00 г, 31,7 ммоль) и Cs_2CO_3 (25,73 г, 79,2 ммоль) в смеси диоксан/H_2O (100 мл/10 мл) обрабатывали $Pd(PPh_3)_4$ (1,10 г, 0,95 ммоль) в атмосфере N_2. Смесь перемешивали при 100°C в течение 2 ч, а затем концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в EtOAc (200 мл) и раствор промывали солевым раствором (100 мл × 3). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 7:1 ~ 5:1) с получением **A2** (4,0 г, 61%) в виде желтого твердого вещества. МС 252,1 $[M + H]^+$.

[0064] ***Получение A3***. Раствор **A2** (4,0 г, 15,94 ммоль) в пиридине (60 мл) при перемешивании обрабатывали фенилхлорформиатом (7,50 г, 47,81 ммоль) путем добавления по каплям при 0°C. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 4 ч. Затем смесь концентрировали в вакууме и неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:ДХМ = 3:2 ~ 1:1) с получением **A3** (7,1 г, 91%) в виде желтого твердого вещества. МС 492,1 $[M + H]^+$.

[0065] ***Получение 118***. Раствор *трет*-бутил-3-оксопирролидин-1-карбоксилата (15,0 г, 81,1 ммоль) и ДМФА-ДМА (29,0 г, 243,3 ммоль) в ТГФ (150 мл) перемешивали при 70°C в

течение 16 ч. Раствор концентрировали в вакууме с получением **118** в виде неочищенного продукта, который применяли непосредственно на следующей стадии. МС 241,1 $[M + H]^+$.

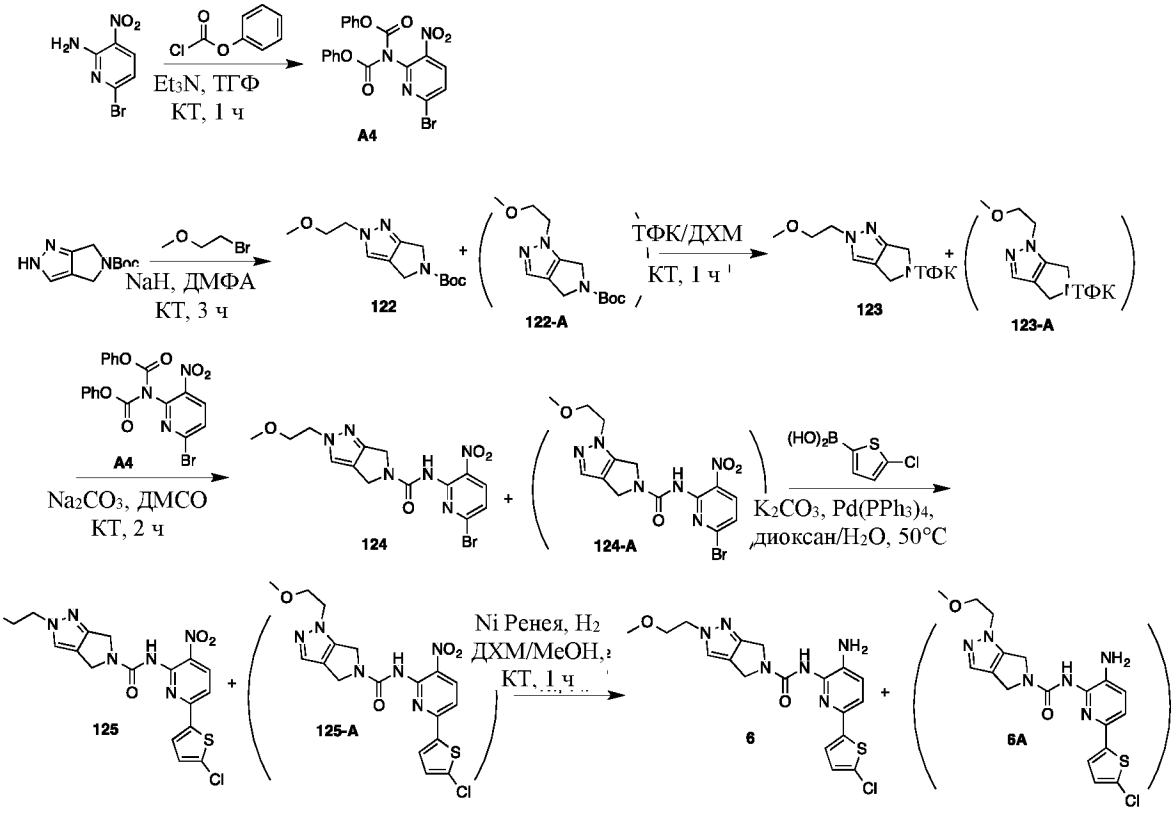
[0066] ***Получение 119***. К раствору **118** (81,1 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в EtOH (100 мл) добавляли Et_3N (40,4 г, 0,4 моль) и ацетимидамида гидрохлорид (30,1 г, 0,32 моль). Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 24 ч. После удаления растворителя в вакууме остаток разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали ДХМ (50 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (50 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:ДХМ = 10:1 ~ 1:2) с получением **119** (10,5 г, 55%) в виде коричневого твердого вещества. МС 236,2 $[M + H]^+$.

[0067] ***Получение 120***. Раствор **119** (600 мг, 2,55 ммоль) в смеси диоксан/HCl (4 н., 10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор концентрировали в вакууме с получением **120** (340 мг, 77%) в виде белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. МС 136,2 $[M + H]^+$.

[0068] ***Получение 121***. Смесь **A3** (231 мг, 0,47 ммоль) и **120** (160 мг, 0,94 ммоль) в ДМСО (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем в указанную выше смесь добавляли Na_2CO_3 (399 мг, 3,76 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции, определяемого путем ЖХМС, реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали EtOAc (10 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 50:1) с получением **121** (120 мг, 62%) в виде желтого твердого вещества. МС 413,2 $[M + H]^+$.

[0069] ***Получение соединения 5***. Смесь **121** (120 мг, 0,29 ммоль) и Pd/C (120 мг) в MeOH (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин в атмосфере H_2. Затем Pd/C удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали и полученный неочищенный остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1) с получением **соединения 5** (52 мг, 47%) в виде белого твердого вещества. МС 383,2 $[M + H]^+$, 405,0 $[M + Na]^+$.

Пример 6. Получение соединения 6



[0070] ***Получение A4***. Раствор 6-бром-3-нитропиридин-2-амина (5,0 г, 23,0 ммоль) и Et_3N (6,9 г, 69,0 ммоль) в ТГФ (60 мл) при перемешивании обрабатывали фенилхлорформиатом (10,8 г, 69,0 ммоль) путем добавления по каплям при 0°C. После завершения добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный остаток повторно кристаллизовывали из петролейного эфира с получением **A4** (10,2 г, 97%) в виде светло-желтого твердого вещества. МС 458,0, 460,0 $[M+H]^+$.

[0071] ***Получение 122 и 122-A***. К раствору *трет*-бутил-4,6-дигидропирроло[3,4-c]пиразол-5(2H)-карбоксилата (15,0 г, 71,8 ммоль) в ДМФА (150 мл) добавляли NaH (60% раствор в минеральном масле) (8,6 г, 215,4 ммоль) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. После завершения добавления полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем в реакционную смесь добавляли 1-бром-2-метоксиэтан (19,8 г, 143,6 ммоль) и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакцию гасили водой (300 мл) и смесь экстрагировали EtOAc (150 мл × 3). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной

хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 30:1) с получением смеси **122** и **122-А** (19,0 г, 99%) в виде бесцветной маслянистой жидкости. МС 268,2 $[M + H]^+$.

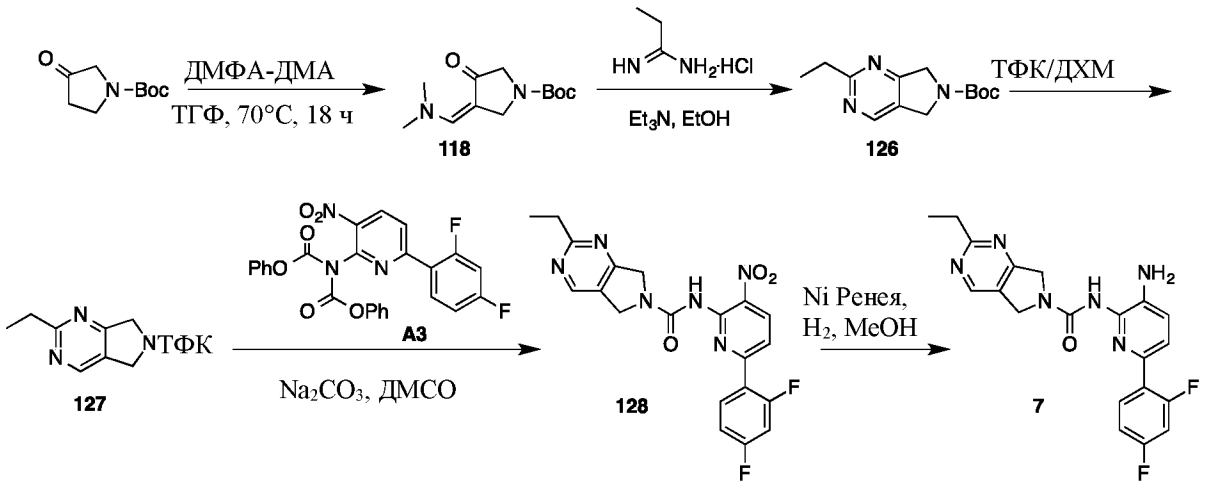
[0072] ***Получение 123 и 123-А***. К раствору **122** и **122-А** (6,5 г, 24,3 ммоль) в ДХМ (60 мл), охлажденной на ледяной бане, добавляли ТФК (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего растворитель удаляли в вакууме с получением **123** и **123-А** в виде неочищенной смеси продуктов, которую применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки. МС 168,1 $[M+H]^+$.

[0073] ***Получение 124 и 124-А***. К раствору **123** и **123-А** (24,3 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) и **А4** (9,3 г, 20,3 ммоль) в ДМСО (200 мл) добавляли Na_2CO_3 (21,5 г, 203 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем смесь разбавляли водой (400 мл) и экстрагировали EtOAc (200 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (100 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 30:1) с получением смеси **124** и **124-А** (4,5 г, 50%) в виде желтого твердого вещества. МС 411,0, 413,1 $[M+H]^+$.

[0074] ***Получение 125 и 125-А***. Смесь **124** и **124-А** (500 мг, 1,22 ммоль), 5-хлортиофен-2-илбороновой кислоты (237 мг, 1,46 ммоль) и K_2CO_3 (169 мг, 1,23 ммоль) в смеси диоксан/H_2O (10 мл/2 мл) обрабатывали $Pd(PPh_3)_4$ (45 мг, 0,06 ммоль) в атмосфере N_2. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 3 ч, а затем концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в EtOAc (30 мл) и полученный раствор промывали солевым раствором (10 мл × 3). Затем органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 20:1) с получением смеси **125** и **125-А** (450 мг, 82%) в виде желтого твердого вещества. МС 449,2 $[M + H]^+$.

[0075] ***Получение соединения 6 и соединения 6А***. Смесь **125** и **125-А** (450 мг, 1,0 ммоль) и Ni Ренея (100 мг) в смеси ДХМ/MeOH (6 мл/6 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Затем Ni Ренея удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали в вакууме и остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1). Затем смесь региоизомеров разделяли путем хиральной ВЭЖХ (колонка: Chiralcel OD-3; растворитель: MeOH; скорость потока: 2 мл/мин; RT_{1843} = 3,477 мин, RT_{1843A} = 4,142 мин) с получением **соединения 6** (99 мг, 24%) в виде белого твердого вещества (МС 419,2 $[M+H]^+$) и **соединения 6А** (50 мг, 12%) в виде белого твердого вещества. МС 419,2 $[M+H]^+$.

Пример 7. Получение соединения 7



[0076] ***Получение 118***. Раствор *трет*-бутил-3-оксопирролидин-1-карбоксилата (600 мг, 3,24 ммоль) и ДМФА-ДМА (1,2 г, 9,72 ммоль) в ТГФ (10 мл) перемешивали при 70°C в течение 16 ч. Раствор концентрировали в вакууме с получением **118** в виде неочищенного продукта, который применяли непосредственно на следующей стадии. МС 241,1 $[M + H]^+$.

[0077] ***Получение 126***. К раствору **118** (3,24 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в EtOH (10 мл) добавляли Et_3N (1,6 г, 16,2 моль) и пропионимидамида гидрохлорид (1,4 г, 13,0 ммоль). Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 20 ч, после чего растворитель удаляли в вакууме, остаток разбавляли водой (10 мл), а затем смесь экстрагировали ДХМ (10 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:ДХМ = 10:1 ~ 1:2) с получением **126** (450 мг, 56%) в виде коричневого твердого вещества. МС 250,2 $[M + H]^+$.

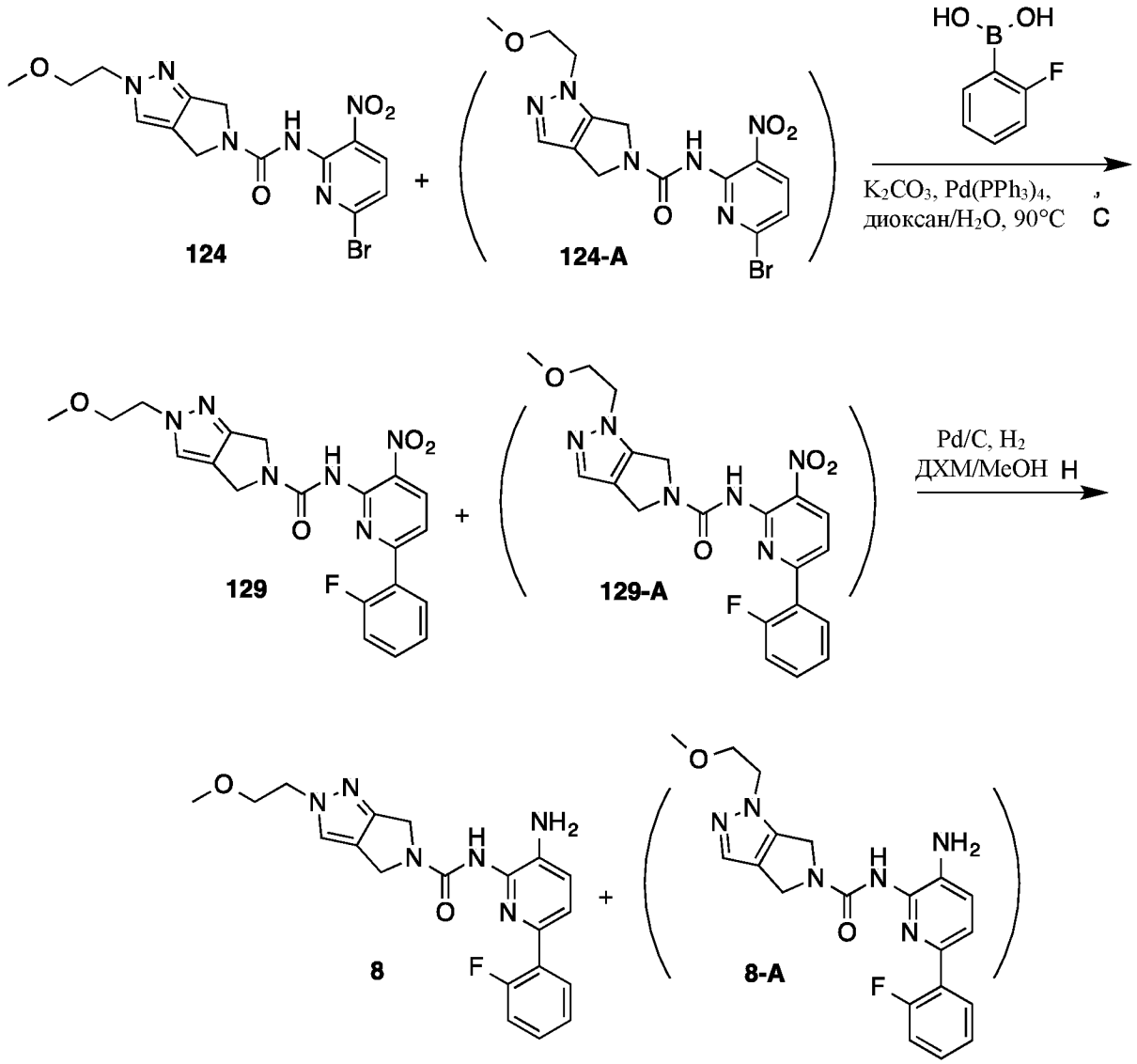
[0078] ***Получение 127***. Раствор **126** (300 мг, 1,2 ммоль) в ДХМ (6 мл) обрабатывали ТФК (3 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Через 1 ч реакция завершалась, что определяли путем ЖХМС, и реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением **127** в виде неочищенного продукта, который применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки. МС 150,2 $[M + H]^+$.

[0079] ***Получение 128***. Смесь **A3** (294 мг, 0,6 ммоль) и **127** (1,2 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в ДМСО (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем добавляли Na_2CO_3 (636 мг, 6,0 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции, определяемого путем ЖХМС, реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и

экстрагировали EtOAc (10 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 50:1) с получением **128** (136 мг, 53%) в виде желтого твердого вещества. МС 427,2 $[M + H]^+$.

[0080] ***Получение соединения 7***. Смесь **128** (120 мг, 0,28 ммоль) и Ni Ренея (120 мг) в MeOH (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Затем Ni Ренея удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали и неочищенный остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1) с получением **соединения 7** (80 мг, 72%) в виде желтого твердого вещества. МС 397,1 $[M + H]^+$.

Пример 8. Получение соединения 8

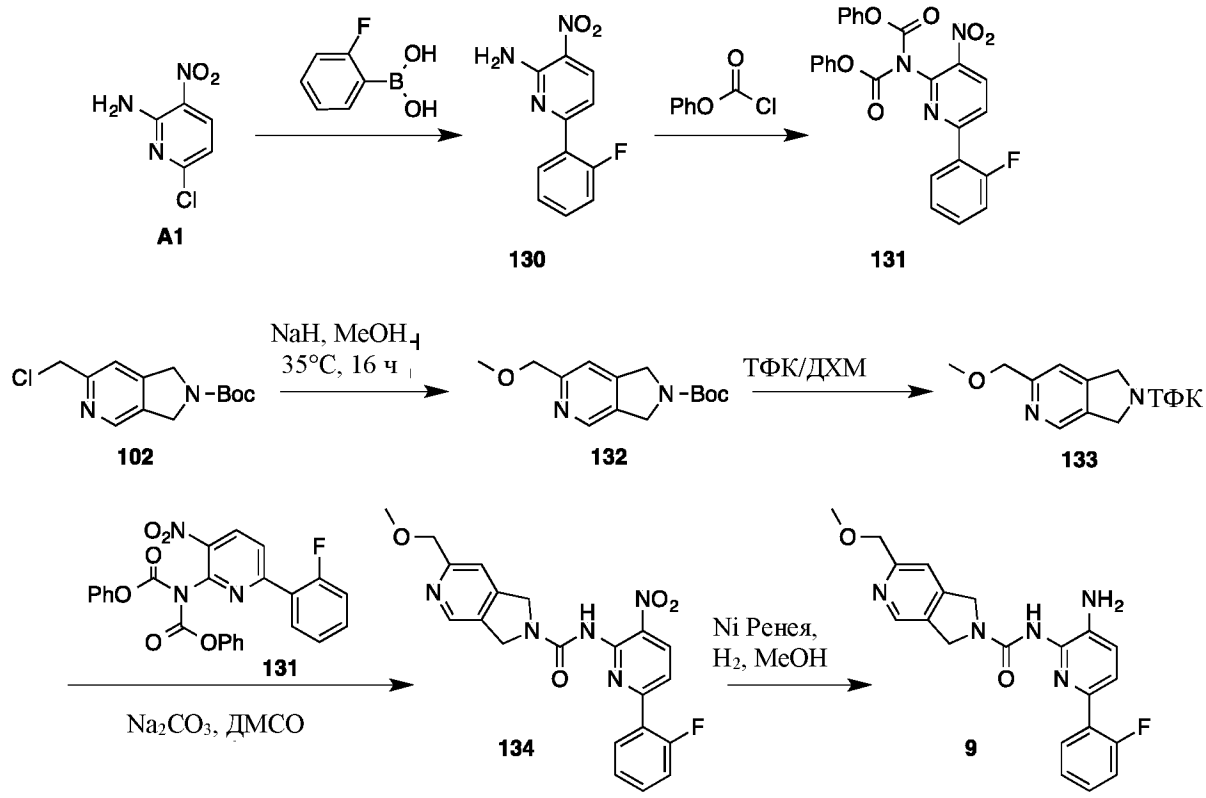


[0081] ***Получение 129 и 129-A***. Смесь **124** и **124-A** (350 мг, 0,85 ммоль), 2-фторфенилбороновой кислоты (143 мг, 1,02 ммоль) и K_2CO_3 (352 мг, 2,55 ммоль) в смеси диоксан/H_2O (10 мл/2 мл) обрабатывали $Pd(PPh_3)_4$ (49 мг, 0,04 ммоль) в атмосфере N_2.

Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 3 ч, а затем концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток растворяли в EtOAc (30 мл) и полученный раствор промывали солевым раствором (10 мл × 3). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем преп. ТСХ (ПЭ:ЕА = 5:1) с получением смеси **129** и **129-A** (300 мг, 83%) в виде желтого твердого вещества. МС 427,2 $[M + H]^+$.

[0082] ***Получение соединения 8 и соединения 8A***. Смесь **129** и **129-A** (300 мг, 0,70 ммоль) и Pd/C (80 мг) в смеси ДХМ/MeOH (5 мл/5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Затем Pd/C удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали и неочищенный остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1). Затем смесь региоизомеров разделяли путем хиральной ВЭЖХ (колонка: Chiralcel OJ-3; растворитель: MeOH; скорость потока: 2 мл/мин; RT_{1849} = 1,201 мин, RT_{1849A} = 2,244 мин) с получением **8** (105 мг, 37%) в виде желтого твердого вещества (МС 397,2 $[M+H]^+$) и **8A** (98 мг, 35%) в виде желтого твердого вещества. МС 397,2 $[M+H]^+$.

Пример 9. Получение соединения 9



[0083] ***Получение 130***. Смесь 6-хлор-3-нитропиридин-2-амина (0,5 г, 2,9 ммоль), 2-фторфенилбороновой кислоты (487 мг, 3,48 ммоль) и K_2CO_3 (1,20 г, 8,7 ммоль) в смеси диоксан/H_2O (10 мл/1 мл) обрабатывали $Pd(PPh_3)_4$ (17 мг, 0,01 ммоль) в атмосфере N_2. Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 2 ч, а затем концентрировали в

вакууме. Неочищенный остаток растворяли в EtOAc (200 мл) и полученный раствор промывали солевым раствором (100 мл × 3). Затем органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 10:1 ~ 3:1) с получением **130** (301 мг, 45%) в виде желтого твердого вещества. МС 234,2 $[M + H]^+$.

[0084] ***Получение 131***. К раствору **130** (301 мг, 1,3 ммоль) в пиридине (10 мл) при перемешивании по каплям добавляли фенилхлорформиат (608 мг, 3,9 ммоль) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. Полученную реакционную смесь перемешивали при 55°C в течение 4 ч, после чего реакционную смесь концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 8:1 ~ 3:1) с получением **131** (500 мг, 82%) в виде желтого твердого вещества. МС 474,2 $[M + H]^+$.

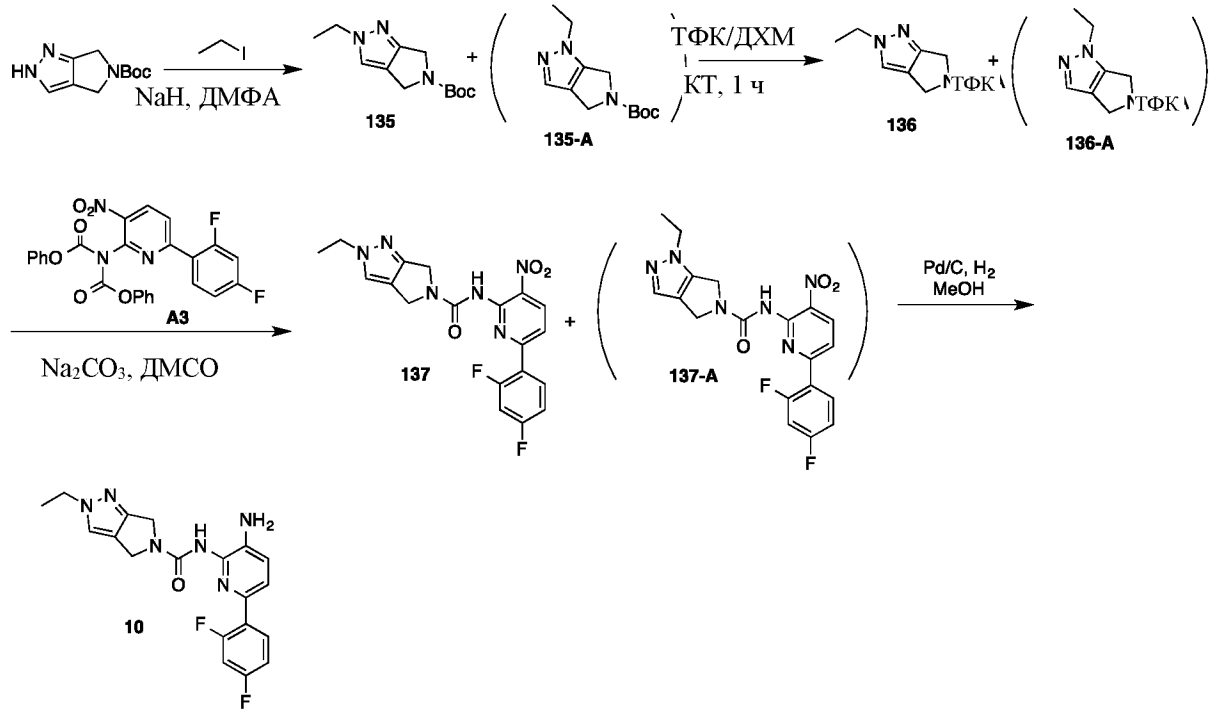
[0085] ***Получение 132***. MeOH (30 мл) в колбе, охлажденной на ледяной бане, обрабатывали NaH (60% раствор в минеральном масле) (940 мг, 23,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Затем добавляли соединение **102** (2,1 г, 7,8 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 ч. Затем реакцию гасили водой (30 мл), смесь экстрагировали ДХМ (10 мл х 3) и объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ:EtOAc = 100:1 ~ 10:1) с получением **132** (1,8 г, 94%) в виде бежевого твердого вещества. МС 265,1 $[M + H]^+$.

[0086] ***Получение 133***. К раствору **132** (220 мг, 0,83 ммоль) в ДХМ (6 мл) по каплям добавляли ТФК (2 мл) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего растворитель удаляли в вакууме с получением **133** в виде неочищенного продукта, который применяли непосредственно на следующей стадии. МС 165,1 $[M + H]^+$.

[0087] ***Получение 134***. Смесь **131** (313 мг, 0,64 ммоль) и **133** (0,83 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в ДМСО (10 мл) обрабатывали Na_2CO_3 (678 мг, 6,4 ммоль), а затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (20 мл) и экстрагировали EtOAc (20 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (20 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (от EA до EA:MeOH = 50:1) с получением **134** (200 мг, 74%) в виде желтого твердого вещества. МС 424,0 $[M+H]^+$.

[0088] ***Получение соединения 9***. Смесь **134** (200 мг, 0,47 ммоль) и Pd/C (200 мг) в смеси ДХМ/MeOH (4 мл/4 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Затем Pd/C удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали и полученный неочищенный остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 10:1) с получением **соединения 9** (105 мг, 57%) в виде желтого твердого вещества. МС 394,2 $[M+H]^+$.

Пример 10. Получение соединения 10



[0089] ***Получение 135 и 135-A***. К раствору *трет*-бутил-4,6-дигидропирроло[3,4-c]пиразол-5(2H)-карбоксилата (250 мг, 1.2 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли NaH (96 мг, 2,4 ммоль (60% раствор в минеральном масле)) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего добавляли йодэтан (374 мг, 2,4 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали EtOAc (10 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме с получением **135** и **135-A** в виде неочищенного продукта. МС 238,2 $[M + H]^+$.

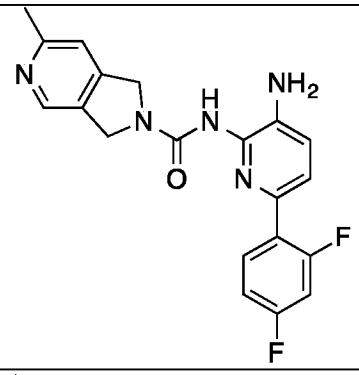
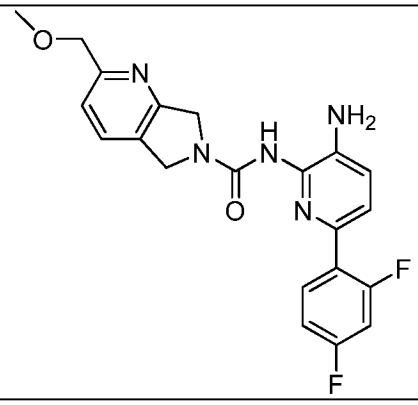
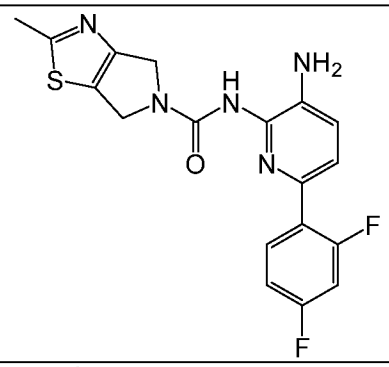
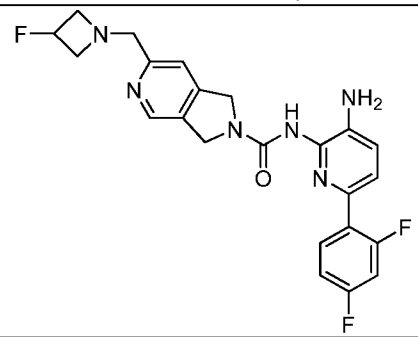
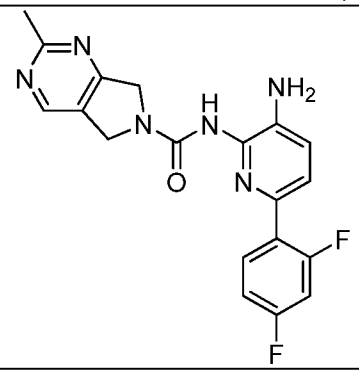
[0090] ***Получение 136 и 136-A***. К раствору **135** и **135-A** (1,2 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) в ДХМ (6 мл) по каплям добавляли ТФК (2 мл) при охлаждении реакционной смеси на ледяной бане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего растворитель удаляли в вакууме с

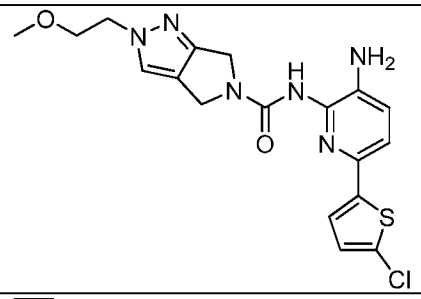
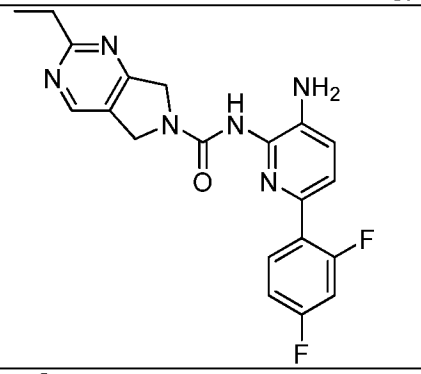
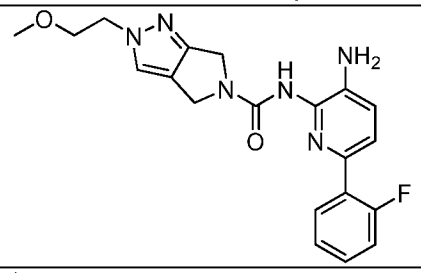
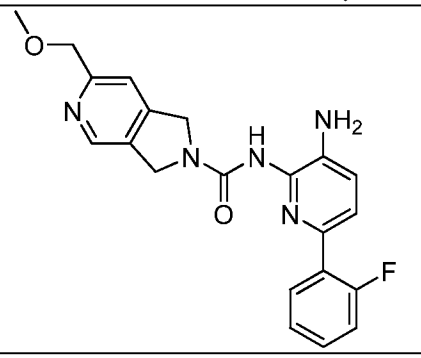
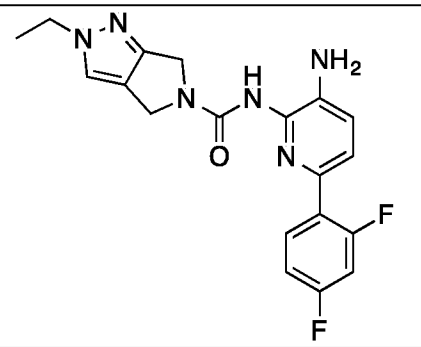
получением **136** и **136-A** в виде неочищенного продукта, который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. МС 138,2 $[M + H]^+$.

[0091] ***Получение 137***. Смесь **136** и **136-A** (1,2 ммоль, неочищенный продукт с предыдущей стадии) и **A3** (491 мг, 1,0 ммоль) в ДМСО (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем добавляли Na_2CO_3 (848 мг, 8,0 моль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (20 мл) и экстрагировали EtOAc (20 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (20 мл × 3), сушили над безводным Na_2SO_4, а затем концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ:MeOH = 100:1 ~ 50:1) с получением неочищенного продукта, который представлял собой смесь региоизомеров **137** и **137-A**. Неочищенный продукт дополнительно очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 30:1) с получением **137** (150 мг, 36%) в виде желтого твердого вещества. МС 415,1 $[M + H]^+$.

[0092] ***Получение соединения 10***. Смесь **137** (150 мг, 0,36 ммоль) и Pd/C (150 мг) в MeOH (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H_2. Затем Pd/C удаляли путем фильтрования через целит, фильтрат концентрировали и остаток очищали путем преп. ТСХ (ДХМ:MeOH = 15:1) с получением **соединения 10** (85 мг, 61%) в виде желтого твердого вещества. МС 385,1 $[M + H]^+$.

Таблица 1. Спектрометрические данные для соединений

№	Структура	МС рассч.	МС получ.	Данные ^{1}H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6)
1		381	382	δ 2,48 (s, 3H), 4,77 (s, 4H), 5,28 (s, 2H), 7,16-7,18 (m, 2H), 7,28-7,31 (m, 2H), 7,40-7,42 (m, 1H), 7,92-7,94 (m, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,56 (s, 1H).
2		411	412	δ 8,59 (s, 1H), 7,98-7,92 (m, 1H), 7,81 (d, *J* = 7,6 Гц, 1H), 7,43-7,40 (m, 1H), 7,36-7,26 (m, 2H), 7,18-7,14 (m, 2H), 5,28 (s, 2H), 4,77 (s, 4H), 4,51 (s, 2H), 3,37 (s, 3H).
3		387	388	δ 8,55 (s, 1H), 7,95 (q, J = 8,80 Гц, 1H), 7,42 (d, J = 2,40 Гц, 1H), 7,33-7,27 (m, 1H), 7,19-7,14 (m, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,68 (d, J = 34,40 Гц, 4H), 2,70 (s, 3H).
4		454	455	δ 8,59 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,97-7,91 (m, 1H), 7,41 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,33-7,27 (m, 1H), 7,19-7,14 (m, 2H), 5,29-5,26 (m, 2,5 H), 5,14-5,12 (m, 0,5H), 4,80 (s, 4H), 3,76 (s, 2H), 3,66-3,58 (m, 2H), 3,28-3,24 (m, 1H), 3,22-3,19 (m, 1H).
5		382	383	δ 8,70 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,97-7,91 (m, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,33-7,27 (m, 1H), 7,18-7,14 (m, 2H), 5,29 (s, 2H), 4,77 (d, *J* = 5,6 Гц, 4H), 2,64 (s, 3H).

6		418	419	δ 8,41 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,51 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 7,34 (d, *J* = 4,0 Гц, 1H), 7,12 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 7,05 (d, *J* = 4,0 Гц, 1H), 5,24 (s, 2H), 4,50 (s, 4H), 4,26 (t, *J* = 5,2 Гц, 2H), 3,68 (t, *J* = 5,6 Гц, 2H), 3,24 (s, 3H).
7		396	396	δ 8,73 (s, 1H), 8,64 (s, 2H), 7,97-7,91 (m, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,0, 3,0 Гц, 1H), 7,32-7,26 (m, 1H), 7,18-7,14 (m, 2H), 5,29 (s, 2H), 4,78 (d, *J* = 10,0 Гц, 4H), 2,92 (q, *J* = 7,6 Гц, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,6 Гц, 3H).
8		396	397	δ 8,47 (s, 1H), 7,93-7,89 (m, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,45-7,43 (m, 1H), 7,35-7,28 (m, 1H), 7,25-7,22 (m, 2H), 7,17 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 5,24 (s, 2H), 4,51 (s, 4H), 4,26 (t, *J* = 5,6 Гц, 2H), 3,68 (t, *J* = 5,2 Гц, 2H), 3,24 (s, 3H).
9		393	394	δ 8,58 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 7,93-7,89 (m, 1H), 7,46-7,44 (m, 2H), 7,35-7,32 (m, 1H), 7,28-7,22 (m, 2H), 7,17 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 5,28 (s, 2H), 4,83 (s, 4H), 4,52 (s, 2H), 3,38 (s, 3H).
10		384	385	δ 8,47 (s, 1H), 7,96-7,93 (m, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,40 (dd, *J* = 8,0, 2,4 Гц, 1H), 7,32-7,26 (m, 1H), 7,18-7,14 (m, 2H), 5,25 (s, 2H), 4,52 (s, 4H), 4,13 (q, *J* = 7,2 Гц, 2H), 1,38 (t, *J* =7,2 Гц, 3H), 3,24 (s, 3H).

Ферментный анализ HDAC2 и HDAC1 (данные IC50 HDAC2)

[0093] Далее описан протокол анализа для измерения деацетилирования пептидного субстрата ферментами HDAC2 или HDAC1. Фермент, субстрат и кофакторы объединяли в лунке планшета для микротитрования и инкубировали в течение 3 часов при 25°C. В конце процесса инкубирования реакцию гасили путем добавления буфера, содержащего ДСН.

Субстрат и продукт разделяли и определяли количественно электрофотерически с применением микрофлюидной системы изыскания новых лекарственных средств LabChip 3000 производства Caliper Life Sciences. Пептидный субстрат, используемый в указанном анализе, представлял собой FAM-TSRHK(AC)KL-CONH2 (FAM представляет собой карбоксифлуоресцеин). Пептид должен иметь чистоту >98% посредством капиллярного электрофореза.

1. В лунку 384-луночного планшета добавляли 5 мкл 2X ферментного буфера. С применением Labcyte Echo 550 добавляли 100 нл соединения. При этом при желании фермент и соединение можно предварительно инкубировать.

2. Добавляли 5 мкл 2X субстратного буфера.

3. Планшет инкубировали при 25°C в течение 17 часов.

4. Завершали протекание реакции путем добавления 40 мкл 1,55X останавливающего буфера.

5. Применяли систему изыскания новых лекарственных средств Caliper LabChip® 3000.

6. Загружали планшет и запускали электрофорез с применением голубого лазера (480 нм) для возбуждения и зеленого CDD (520 нм) для детектирования (CCD2).

Время реакции = 17 часов; температура реакции = 25°C.

Конечная реакционная смесь для анализа

[0094] 100 мМ HEPES pH 7,5, 0,1% БСА, 0,01% Triton X-100, 25 мМ KCl.

[0095] 1% ДМСО (от соединения), 1 мкМ FAM-TSRHK(AC)KL-CONH2, 5 нМ фермент HDAC (удельная активность можеть варьироваться от партии к партии, и может потребоваться корректировка концентрации фермента для получения ~10-20% конверсии субстрата в продукт).

[0096] Пептидные субстраты и продукты, присутствующие в каждом из образцов, разделяли электрофоретически с применением прибора для капиллярного электрофореза LabChip 3000. При разделении пептидных субстратов и продуктов наблюдали два пика флуоресценции. Изменение относительной интенсивности флуоресценции пиков субстрата и продукта представляло собой измеряемый параметр, отражающий активность фермента. Капиллярные электрофореграммы (файлы собранных RDA данных) анализировали с применением программного обеспечения HTS Well Analyzer (Caliper Life Sciences). Активность фермента в каждом из образцов определяли как отношение продукта к сумме (PSR): P/(S+P), где P представляет собой высоту пика пептидного продукта, и S представляет собой высоту пика пептидного субстрата. Для каждого соединения

активность фермента измеряли при различных концентрациях (12 концентраций соединения с интервалом, составляющим 3-кратное разбавление). Образцы отрицательного контроля (0% ингибирование при отсутствии ингибитора) и образцы положительного контроля (100% ингибирование в присутствии 20 мМ ЭДТА) собирали в четырех экземплярах и применяли для расчета значений % ингибирования для каждого из соединений при каждой концентрации. Процент ингибирования (P_{inh}) определяли с применением следующего уравнения: $P_{inh} = (PSR_{0\%} - PSR_{inh})/(PSR_{0\%} - PSR_{100\%})*100$, где PSR_{inh} представляет собой отношение продукта к сумме в присутствии ингибитора, $PSR_{0\%}$ представляет собой среднее отношение продукта к сумме при отсутствии ингибитора, и $PSR_{100\%}$ представляет собой среднее отношение продукта к сумме в контрольных образцах со 100% ингибированием.

[0097] Значения IC50 для ингибиторов определяли путем построения кривых ингибирования (P_{inh} в зависимости от концентрации ингибитора) при помощи 4-параметрической сигмоидальной модели доза-ответ с применением программного обеспечения XLfit 4 (IBDS).

[0098] Результаты указанного анализа для конкретных соединений приведены ниже в **таблице 2**. В таблице “A” обозначает значение K_d менее 0,1 мкМ; “B” обозначает значение K_d от 0,1 мкМ до 0,5 мкМ; “C” обозначает значение K_d от более 0,5 мкМ до не более 5,0 мкМ; и “D” обозначает значение K_d более 5,0 мкМ.

Таблица 2

№ соединения	HDAC2 IC50, (мкМ)	HDAC1 IC50, (мкМ)	№ соединения	HDAC2 IC50, (мкМ)	HDAC1 IC50, (мкМ)
1	B	B	**6**	C	C
2	C	B	**7**	C	B
3	C	B	**8**	C	B
4	C	B	**9**	C	B
5	C	C	**10**	B	B

Анализ ферментативного ингибирования HDAC2 в клеточном лизате SH-SY5Y

[0099] Клеточная культура и обработка ингибитором

[00100] Клетки SH-SY5Y (Sigma) культивировали в модифицированной минимальной питательной среде Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина. За двадцать четыре часа перед дозированием соединения 20 мкл клеток высеивали в белые 384-луночные планшеты с плотностью 1500 клеток/лунка. Соединения серийно разбавляли в чистом ДМСО, а затем разбавляли в отношении 1:100 об./об. в среде без ФБС и смешивали. Среду удаляли из высеянных клеток, добавляли разбавленные соединения в бессывороточной среде (1% об./об. конечного ДМСО) и инкубировали при 37°C в течение пяти часов. Затем добавляли десять мкл реагента HDAC-Glo 2 с 0,1% Triton X-100, планшет перемешивали и оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на 100 минут. Затем планшеты считывали люминометром Spectramax LMax с использованием времени интегрирования 0,4 с. Кривые доза-ответ строили по нормализованным данным, где CI-994 при 100 мкМ определяли как 100% ингибирование и только ДМСО определяли как 0% ингибирование.

[00101] Результаты указанного анализа для конкретных соединений приведены ниже в **таблице 3**. В таблице "A" обозначает значение IC_{50} от 0,1 мкМ до 1 мкМ; "B" обозначает значение IC_{50} от 1,0 мкМ до 1,5 мкМ; и "C" обозначает значение IC_{50} более 1,5 мкМ.

Таблица 3

№ соединения	HDAC2 IC50, клеточный лизат SH-SY5Y (мкМ)	№ соединения	HDAC2 IC50, клеточный лизат SH-SY5Y (мкМ)
1	A	**6**	C
2	B	**7**	A
3	A	**8**	A
4	B	**9**	A
5	B	**10**	A

Эритроидный и миелоидный КОЕ-анализ

[00102] Клоногенные клетки-предшественники линий эритроцитов (КОЕ-Э, БОЕ-Э), гранулоцитов-моноцитов (КОЕ-ГМ) и мультифункциональных линий (КОЕ-ГЭММ)

человека оценивали в полутвердом составе среды на основе метилцеллюлозы, содержащем rhIL-3 (10 нг/мл), rhGM-SCF (10 нг/мл), rhSCF (50 нг/мл) и Epo (3 ед/мл).

Клетки

[00103] Клетки костного мозга здорового человека с низкой плотностью, полученные из здорового костного мозга (NorCal Biologics, California) и квалифицированные в ReachBio, хранили в газовой фазе жидкого азота (-152°C) до проведения анализа. В день эксперимента клетки подвергали быстрому оттаиванию, содержимое каждого из флаконов разбавляли в 10 мл среды Дульбекко, модифицированной по способу Исков, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (IMDM + 10% ФБС), и промывали путем центрифугирования (примерно 1200 об/мин в течение 10 минут, комнатная температура). Надосадочную жидкость отбрасывалии и клеточный осадок повторно суспендировали в известном объеме IMDM + 10% ФБС. Для образца костного мозга проводили подсчет клеток (3% ледяная уксусная кислота) и оценку жизнеспособности (тест на вытеснение трипанового синего).

Соединения

[00104] В день эксперимента соединения растворяли в ДМСО до базовой концентрации 10 мМ. Из базовой концентрации готовили серийные разбавления с получением концентраций 2 и 0,4 мМ. При добавлении в среду на основе метилцеллюлозы в отношении 1:1000 (об./об.) получали конечные тестовые коцентрации 10, 2 и 0,4 мкМ. Кроме того, оценивали 5-ФУ в концентрациях 1,0, 0,1 и 0,01 мкг/мл.

Описание способа

[00105] Клоногенные клетки-предшественники эритроидных (КОЕ-Э и БОЕ-Э), миелоидных (КОЕ-ГМ) линий человека получали в составах сред на основе метилцеллюлозы, описанных выше. Все соединения добавляли в среду с получением желаемых конечных концентраций (10, 2 и 0,4 мкМ). 5-Фторурацил (Sigma Aldrich) использовали в качестве положительного контроля для пролиферации клеток-предшественников (ингибирование роста колоний) и вводили в культуры костного мозга человека в концентрациях 1,0, 0,1 и 0,01 мкг/мл. Также применяли культуры контроля растворителем (не содержащие соединение и содержащие 0,1% ДМСО), а также стандартные контроли (не содержащие соединение и ДМСО).

[00106] Анализы миелоидных и эритроидных клеток-предшественников человека проводили при концентрации 2,0 x 10^4 клеток на культуру. После культивирования в течение 14 дней миелоидные и эритроидные колонии подвергали изучению при помощи микроскопа и оценке обученным персоналом. По размеру и морфологии колонии разделяли на следующие категории: КОЕ-Э, БОЕ-Э, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ.

Статистические анализы количества КОК

[00107] Для клеток-предшественников каждой категории (КОЕ-Э, БОЕ-Э и т.д.) рассчитывали среднее ± одно СКО для трех экземпляров культур. Двухсторонние t-тесты проводили для оценки наличия разницы в количестве полученных колоний между контролем растворителем и обработанными культурами. Из-за потенциальной субъективности подсчета колоний значение p менее 0,01 считали значительным. Для расчета концентрации для 50% ингибирования роста колоний (IC_{50}) для каждого соединения строили кривую доза-ответ на графике зависимости log концентрации соединения от процента роста контрольной колонии с применением программного обеспечения XLfit (IDBS). Концентрацию для 50% ингибирования роста колоний (IC_{50}) рассчитывали на основе построения сигмоидальной кривой с применением формулы дозозависимой, однопараметровой модели: y = A + [(B – A)/(1 + ((C/x) ^ D))], где A = начальное значение (базовый ответ), B = максимальный ответ, C = центр (концентрация лекарственного средства, которая вызывает ответ посередине между A и B), и D = наклон кривой в серединной точке. Кроме того, с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 получали графики и дополнительные кривые доза-ответ.

Морфологическая оценка колоний

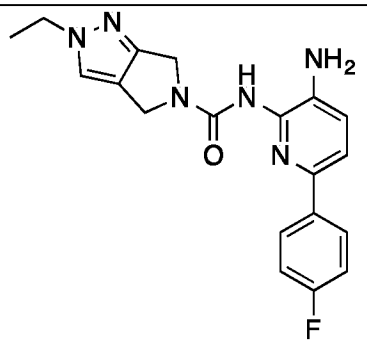
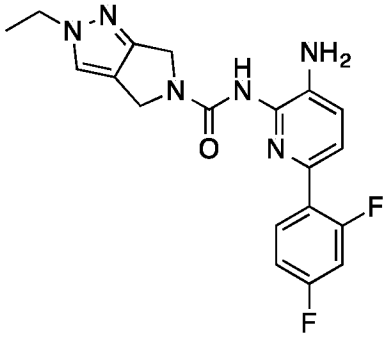
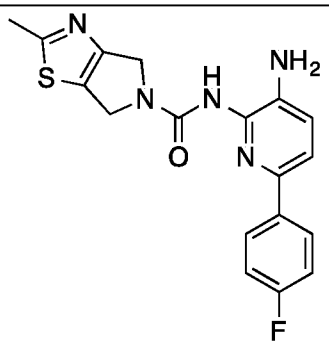
[00108] Получали фотографии типовых колоний, полученных из гематопоэтических клеток-предшественников, для различных линий, иллюстрирующие колонии в присутствии контроля растворителем, а также колонии в присутствии испытываемых соединений.

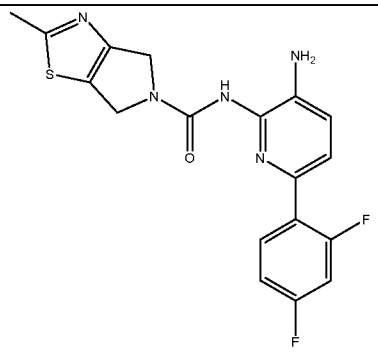
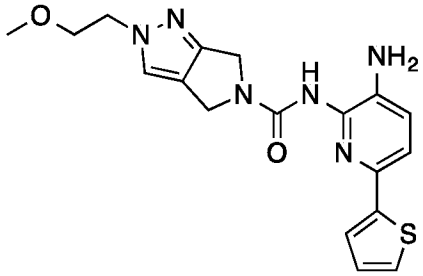
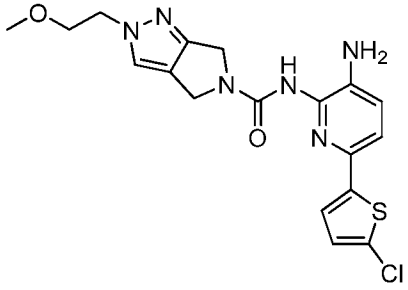
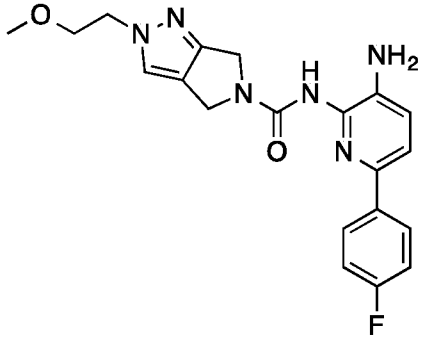
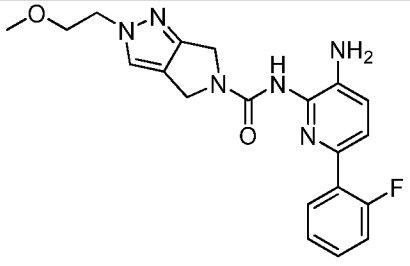
[00109] Обученный персонал проводил подсчет эритроидных (КОЕ-Э и БОЕ-Э), миелоидных (КОЕ-ГМ) и мультифункциональных (КОЕ-ГЭММ) колоний. Анализировали распределение типов колоний, а также общую морфологию колоний и клеток. Для статистического анализа количество колоний в культурах, обработанных соединениями, сравнивали с культурами контроля растворителем. В указанных анализах в качестве положительного контроля токсичности применяли 5-ФУ, и ингибирующие эффекты, полученные для указанного соединения, являлись точно такими, как ожидалось. Эксперимент использовали для оценки потенциального влияния испытываемых соединений на пролиферакцию эритроидных и миелоидных клеток-предшественников

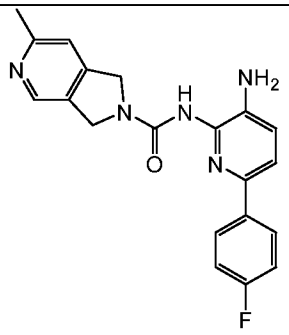
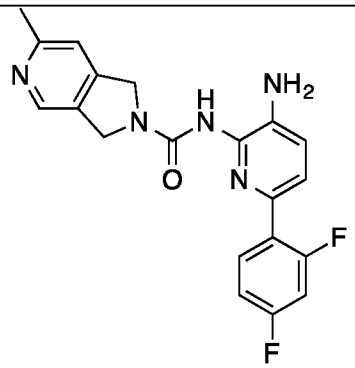
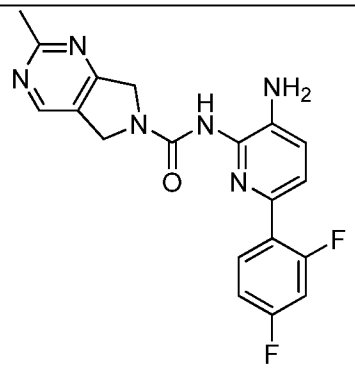
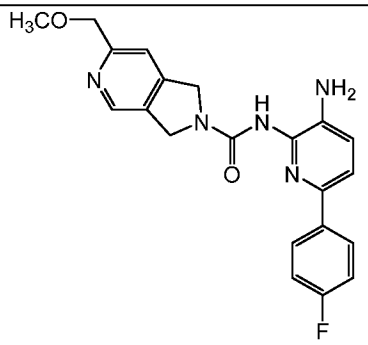
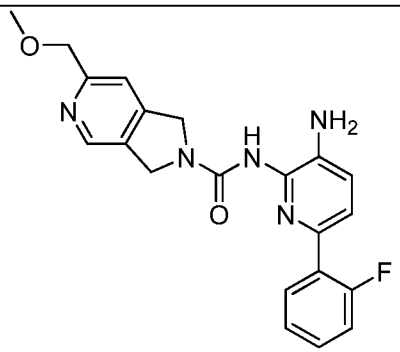
человека в среде на основе метилцеллюлозы. Значения IC_{50} рассчитывали с применением XLfit. Кривые доза-ответ для эритроидной и миелоидной токсичности получали при помощи XLfit. Наконец, подстановку в кривые нелинейной регрессии и вычисление значений IC_{50} ± 95% ДИ проводили в Prism 7.0.-GEMM.

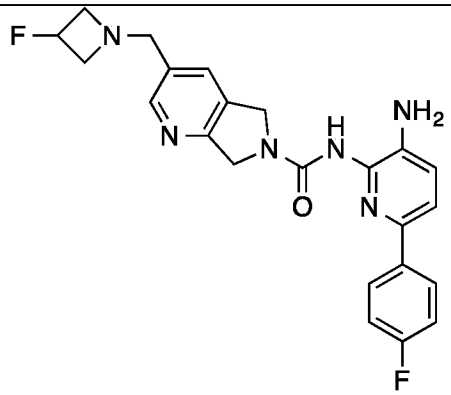
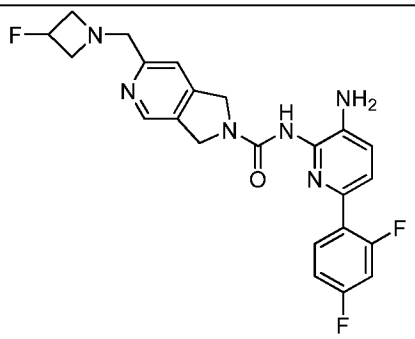
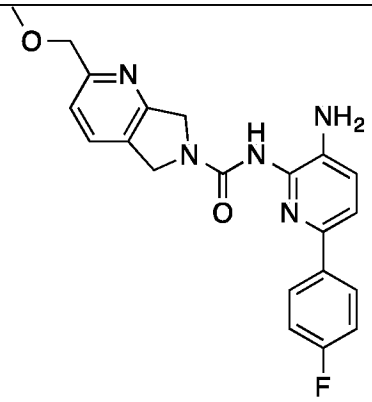
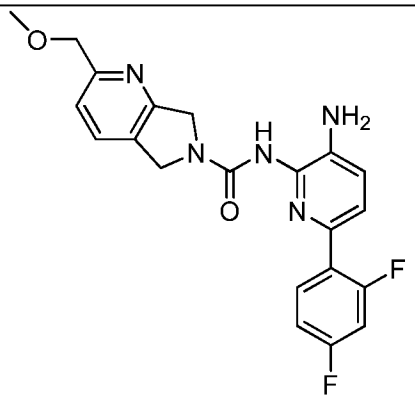
[00110] Результаты представлены в **таблице 4**.

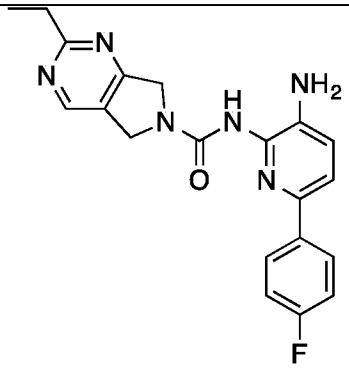
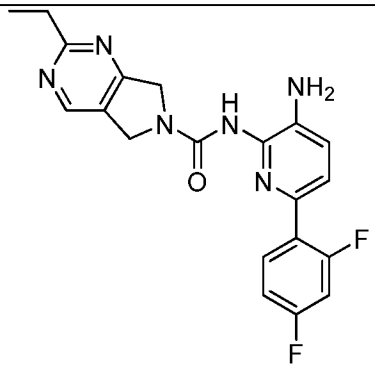
Таблица 4

Соединение	**Структура**	**% эритроидного контроля, остающийся при 10 мкМ дозе**	**% миелоидного контроля, остающийся при 10 мкМ дозе**
Соединение сравнения 1		22	34
10		38	77
Соединение сравнения 2		45	103

3		89	109
Соединение сравнения 3		18	9
6		69	82
Соединение сравнения 4		28	39
8		72	75

Соединение сравнения 5		25,7	66.1
1		53	100
5		69	82
Соединение сравнения 6		22.9	58.9
9		87	102

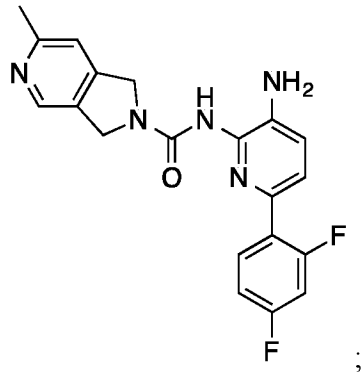
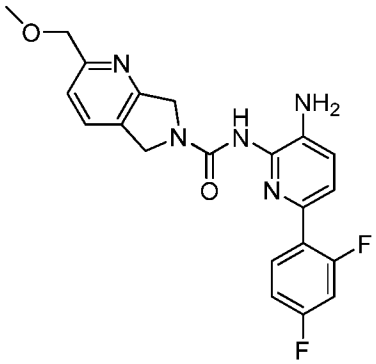
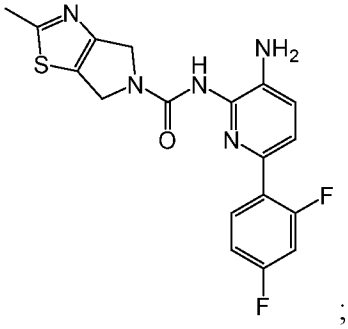
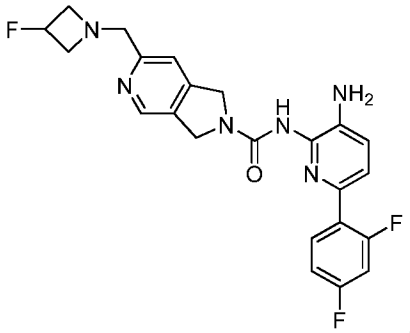
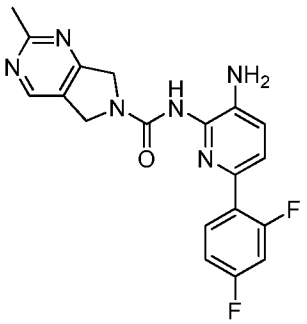
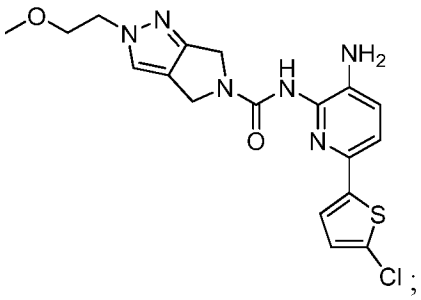
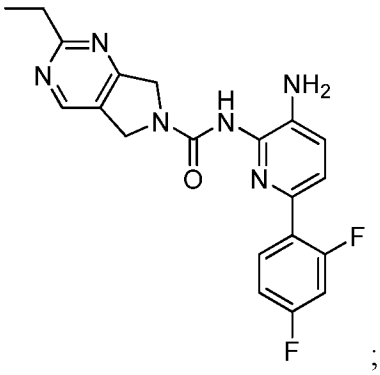
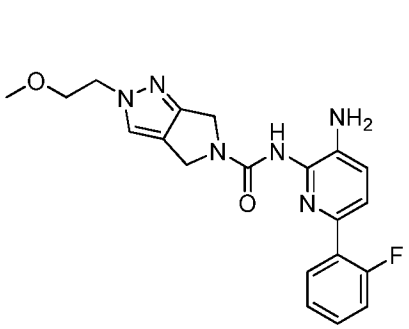
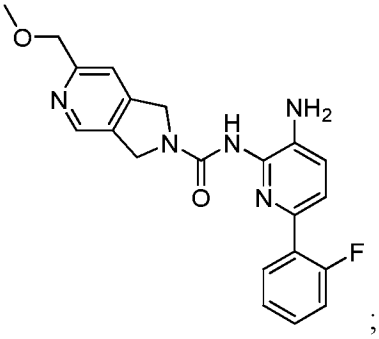
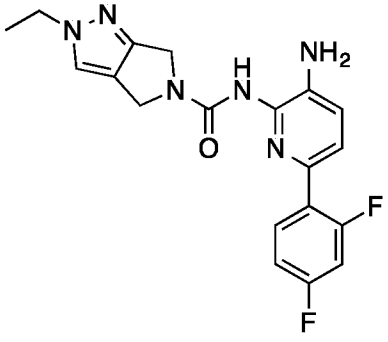
Соединение сравнения 7		35	82
4		62	102
Соединение сравнения 8		33	70
2		62	92

Соединение сравнения 9		60	79
7		69	105

[00111] Содержание всех ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), приведенных в настоящей заявке, явным образом включены в настоящую заявку во всей своей полноте посредством ссылки. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящей заявке, соответствуют значениям, общеизвестным специалистам в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

или ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

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

3. Способ ингибирования активности HDAC у субъекта, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п. 1, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции по п. 2.

4. Способ лечения состояния у субъекта, выбранного из неврологического расстройства, расстройства или нарушения памяти или когнитивных функций, расстройства торможения обучаемости, грибкового заболевания или инфекции, воспалительного заболевания, гематологического заболевания, психических расстройств и неопластического заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п. 1, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции по п. 2.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что состояние представляет собой:

a. расстройство или нарушение когнитивной функции, связанное с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, вызванной припадком потерей памяти, шизофренией, синдромом Рубинштейна-Тейби, синдромом Ретта, синдромом ломкой Х-хромосомы, болезнью диффузных телец Леви, сосудистой деменцией, лобно-височной деменцией, СДВГ, дислексией, биполярным расстройством и расстройством социального поведения, когнитивными расстройствами и расстройствами обучаемости, связанными с аутизмом, травматическим повреждением мозга, расстройством дефицита внимания, тревожным расстройством, условно-рефлекторной реакцией страха, паническим расстройством, обсессивно-компульсивным расстройством, посттравматическим стрессовым расстройством (PTSD), фобией, социальным тревожным расстройством, лечением лекарственной зависимости, возрастным нарушением памяти (AAMI), возрастным снижением когнитивных функций (ARCD), атаксией или болезнью Паркинсона; или

b. гематологическое заболевание, выбранное из острого миелоидного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, миелодиспластических синдромов и серповидноклеточной анемии; или

c. неопластическое заболевание; или

d. расстройство торможения обучаемости, выбранное из подавления страха и посттравматического стрессового расстройства.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, атаксию Фридрейха, посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD), болезнь Паркинсона или лечение лекарственной зависимости.