

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090930** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.08.06

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.09

(54) **СОЕДИНЕНИЯ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ CDK7**

(31) **17382778.3; 18382034.9; 18382546.2**

(32) **2017.11.16; 2018.01.23; 2018.07.20**

(33) **EP**

(86) **PCT/US2018/060025**

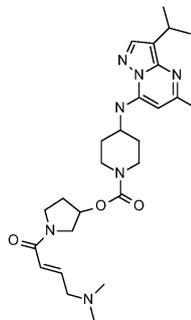
(87) **WO 2019/099298 2019.05.23**

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

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

(72) Изобретатель:
**Коутс Дэвид Эндрю, Монтеро Карлос,
Пател Бхарвин Кумар Рамешандра,
Ремик Дэвид Майкл, Ядав Випин (US)**

(57) В данном изобретении представлены новые ингибиторы CDK7 и их фармацевтические композиции



(I)

или их фармацевтически приемлемая соль.

A1

202090930

202090930

A1

СОЕДИНЕНИЯ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ CDK7

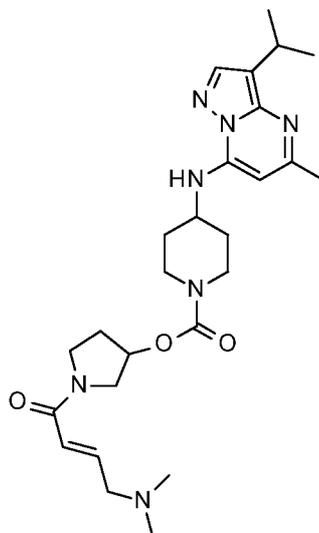
Данное изобретение относится к соединениям, пригодным для ингибирования циклинзависимой киназы 7 (CDK7), фармацевтическим композициям и способам лечения заболеваний, связанных с активностью CDK7.

Циклинзависимые киназы (CDK) являются основным классом киназ и играют важную роль в пролиферации раковых клеток и нерегулируемой онкогенной транскрипции. CDK7 связывается с циклином H и MAT1 с образованием тримерной циклин-активирующей киназы (CAK), которая выполняет свою функцию путем фосфорилирования других CDK, участвующих в контроле клеточного цикла. Эти комплексы контролируют специфические переходы между двумя последующими фазами клеточного цикла. CDK7 участвует как во временном контроле клеточного цикла, так и в транскрипционной активности. CDK7 участвует в процессе инициации транскрипции путем фосфорилирования субъединицы Rbp1 РНК-полимеразы II (RNAPII). Неконтролируемая клеточная пролиферация и нерегулируемая транскрипция являются признаком рака. Селективное нацеливание на CDK7 может дать преимущество, одновременно ингибируя активную транскрипцию и прогрессирование клеточного цикла. Следовательно, CDK7 является многообещающей мишенью для лечения рака, в частности, агрессивных и трудно поддающихся лечению раков.

Низкомолекулярные ингибиторы CDK7 были описаны в литературе (*см., например, WO 2015/154022, WO 2016/142855, WO 2016/160617, WO 2016/193939 и WO 2017/044858*). Сохраняется потребность в обеспечении ингибиторов CDK7, которые можно применять при лечении клеточно-пролиферативных расстройств, таких как рак. Кроме того, существует необходимость в предложении ингибиторов CDK7, которые являются селективными по отношению к CDK7 по сравнению с другими CDK.

Данное изобретение относится к новым соединениям, которые являются селективными ингибиторами CDK7. Указанные новые соединения могут удовлетворять потребность в сильнодействующем, эффективном лечении рака, особенно, рака с нерегулируемой транскрипцией. Данное изобретение также может удовлетворять потребность в мощном, эффективном лечении рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи и/или глиом.

В данном изобретении предложено соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль. Особенно предпочтительной является безилатная соль. Также предпочтительной является соль геми-эдизилат гидрат.

Данное изобретение также относится к способу лечения рака, в частности, для лечения рака с нерегулируемой транскрипцией. Предпочтительно, указанный рак представляет собой рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы. Более предпочтительно, указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. Наиболее предпочтительно, указанный рак представляет собой рак молочной железы.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом у пациента, включающий тестирование на наличие по меньшей мере одной мутации с потерей функции в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и/или *RBI* в биологическом образце от пациента и введение терапевтически эффективного количества соединения или его соли по данному изобретению, в частности, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-a]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли

пациенту, если тесты указанного образца являются положительными на, по крайней мере, одну мутацию с потерей функции в любом из генов *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и/или *RBI*. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Более предпочтительно, указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. Наиболее предпочтительно, указанный рак представляет собой рак молочной железы. Предпочтительно, указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК. Предпочтительно, указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли, предпочтительно, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *ARID1A*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2C*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2D*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *RBI*.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения или его соли по данному изобретению, в частности, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, если биологический образец от указанного пациента содержит, по крайней мере, одну мутацию с потерей функции генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и/или *RBI*. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Более предпочтительно, указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. Наиболее предпочтительно, указанный рак представляет собой рак молочной железы. Предпочтительно, указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК. Предпочтительно, указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли, предпочтительно, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-

2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *ARID1A*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2C*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2D*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *RBI*.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения или его соли по данному изобретению, в частности, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, если указанный пациент выбран для лечения если биологический образец от указанного пациента дал положительный результат тестирования на, по крайней мере, одну мутацию с потерей функции генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и/или *RBI*. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Более предпочтительно, указанный рак выбран из группы, включающей колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. Наиболее предпочтительно, указанный рак представляет собой рак молочной железы. Предпочтительно, указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК. Предпочтительно, указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли, предпочтительно, [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту. Предпочтительно, указанная соль представляет собой безилатную соль или соль геми-эдилизат гидрат. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *ARID1A*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2C*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *KMT2D*. Предпочтительно, указанный ген представляет собой ген *RBI*.

Данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по данному изобретению или его фармацевтически приемлемую

соль, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. В дополнительном варианте реализации изобретения указанная композиция дополнительно содержит один или более другой терапевтический агент. В дополнительном варианте реализации изобретения в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая соединение по данному изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. В еще дополнительном варианте реализации изобретения в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для лечения рака с нерегулируемой транскрипцией, содержащая соединение по данному изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. В указанных вариантах реализации изобретения указанный рак представляет собой рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы.

В предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. В более предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой рак молочной железы.

Дополнительно, в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения при лечении рака, дополнительно включающего проведение анализа *in vitro* с применением биологического образца от пациента, определение наличия по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и *RBI*, и введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его соли пациенту, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из указанных генов. В указанном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы. Предпочтительно, указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК. Предпочтительно, указанное соединение или его соль вводят пациенту при дозе от около

1 мг до 2 г. Предпочтительно, указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли пациенту. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию инактивирующей мутации в гене *ARID1A*. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию инактивирующей мутации в гене *KMT2C*.

Предпочтительно, пациента выбирают по наличию инактивирующей мутации в гене *KMT2D*. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию инактивирующей мутации в гене *RBI*.

Дополнительно, в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в лечении, в частности, для лечения рака с нерегулируемой транскрипцией. В дополнительном варианте реализации изобретения, в данном изобретении предложено применение соединения в соответствии с данным изобретением или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления лекарственного средства для лечения рака с нерегулируемой транскрипцией. В указанных вариантах реализации изобретения указанный рак представляет собой рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы. В предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак выбран из колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника или рака желудка. В более предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой рак молочной железы.

В еще дополнительном варианте реализации изобретения, в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в лечении, в частности, для лечения рака. В дополнительном варианте реализации изобретения, в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления лекарственного средства для лечения рака. В указанных вариантах реализации изобретения указанный рак представляет собой рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы. В предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. В более предпочтительном варианте реализации изобретения указанный рак представляет собой рак молочной железы. Дополнительно, в данном изобретении предложено

применение указанного соединения для изготовления лекарственного средства для лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, раков шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом, дополнительно включающего проведение анализа *in vitro* с применением биологического образца от пациента, определение наличия по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и *RBI*, и введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его соли пациенту, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из указанных генов. Предпочтительно, указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК. Предпочтительно, указанное соединение или его соль вводят пациенту при дозе от около 1 мг до 2 г. Предпочтительно, указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли пациенту. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2C*. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2D*. Предпочтительно, пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *RBI*.

В данном изобретении предложено соединение по данному изобретению [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат в форме кристаллической соли. В данном изобретении также предложен кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат. В данном изобретении также предложен [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат в кристаллической форме, характеризующийся порошковой рентгенограммой с использованием излучения $\text{CuK}\alpha$, имеющей характеристические пики при $2\theta \pm 0,2^\circ$, наблюдаемые при $18,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, включающей $21,5^\circ$, $16,7^\circ$ и $15,2^\circ$. В данном изобретении также предложен кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат. В данном изобретении также предложен

[(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат в кристаллической форме, характеризующийся порошковой рентгенограммой с использованием излучения CuKa, имеющей характеристические пики при $2\theta \pm 0,2^\circ$, наблюдаемые при $21,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, включающей $12,4^\circ$, $17,3^\circ$ и $15,8^\circ$. В данном изобретении также предложен кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат гидрохлорид. В данном изобретении также предложен [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат гидрохлорид в кристаллической форме, характеризующийся порошковой рентгенограммой с использованием излучения CuKa, имеющей характеристические пики при $2\theta \pm 0,2^\circ$, наблюдаемые при $18,9^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, включающей $5,5^\circ$, $15,5^\circ$ и $9,7^\circ$.

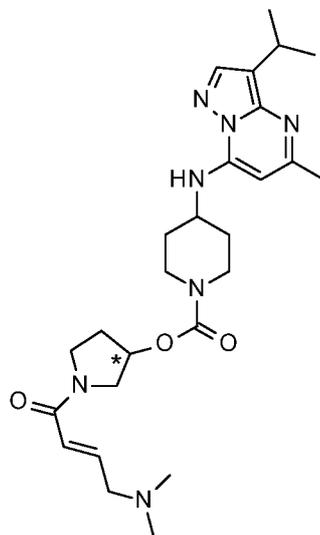
Данное изобретение включает также промежуточные соединения и способы, пригодные для синтеза соединения по данному изобретению.

Термин «лечение» (или «лечить»), как используется в данном документе, относится к ограничению, замедлению, остановке или реверсированию развития или тяжести существующего симптома, состояния или расстройства.

Как используется в данном документе, термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у пациентов, которое как правило характеризуется нерегулируемой пролиферацией клеток. В данное определение включены доброкачественные и злокачественные опухоли. Под «раком на ранней стадии» или «опухолью на ранней стадии» подразумевается рак, который не является запущенным или метастатическим или классифицируется как рак на стадии 0, I или II. Примеры рака включают, но не ограничиваясь ими, рак уротелия, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, раки шейки матки, рак простаты, гематологические раки, саркомы, раки кожи или глиомы.

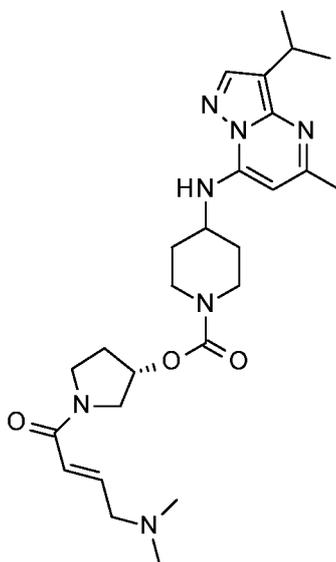
Соединение по данному изобретению может вступать в реакцию с образованием фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически приемлемые соли и общие методики их получения хорошо известны в данной области техники (см, например, P. Stahl, *и др.* *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, 2^е исправленное издание (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *и др.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, Январь 1977).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что соединение по данному изобретению, как проиллюстрировано в (I), или его фармацевтически приемлемая соль, состоит из основного фрагмента, который содержит один хиральный центр, как представлено * ниже:



(I)

Хотя в данном изобретении рассматриваются все индивидуальные энантиомеры, а также смеси энантиомеров указанных соединений, включая рацематы, предпочтительное соединение по данному изобретению представлено (II) ниже:



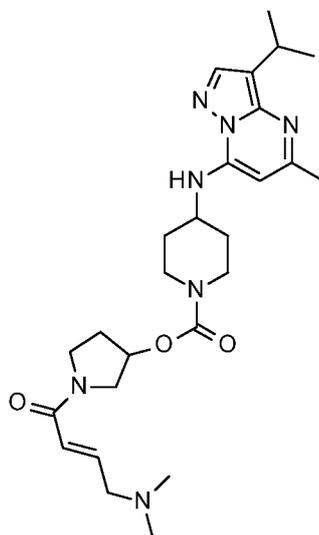
(II)

или его фармацевтически приемлемые соли.

Специалистам в данной области техники понятно также, что обозначения Кана-Ингольда-Прелога (R) или (S) для всех хиральных центров варьируются в зависимости от характера замещения конкретного соединения. Отдельные энантиомеры можно получать,

исходя из хиральных реагентов, или технологиями стереоселективного или стереоспецифического синтеза. В альтернативном варианте, отдельные энантиомеры могут быть выделены из смесей стандартными приемами хиральной хроматографии или кристаллизации в любой удобный момент синтеза соединений по данному изобретению. Отдельные энантиомеры соединений по данному изобретению представляют собой предпочтительный вариант реализации изобретения.

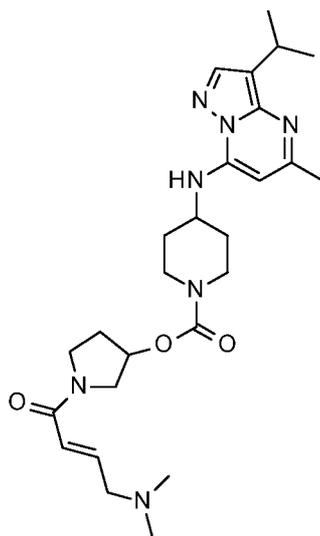
Соединение по данному изобретению предпочтительно составляют в виде фармацевтических композиций, вводимых различными путями. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см, например., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro, *и др.*, изд., 21е изд., Mack Publishing Co., 2005)). Более предпочтительной является фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы,



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, и один или более фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

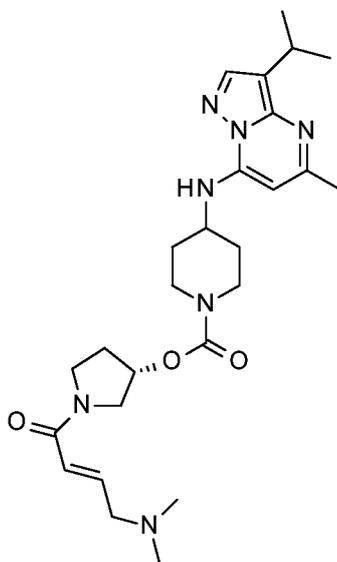
Предпочтительный вариант реализации данного изобретения представляет собой



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль.

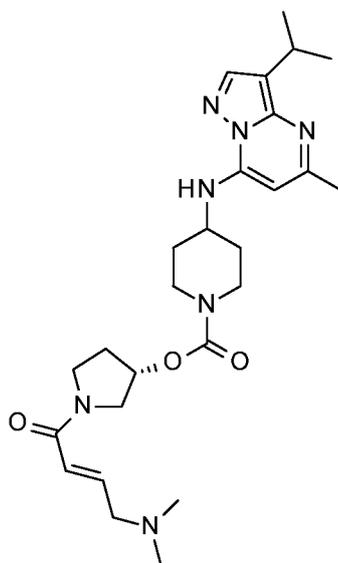
Особенно предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению (3S)-1-[(2E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил 4-[[5-метил-3-(пропан-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил]амино} пиперидин-1-карбоксилату:



(II)

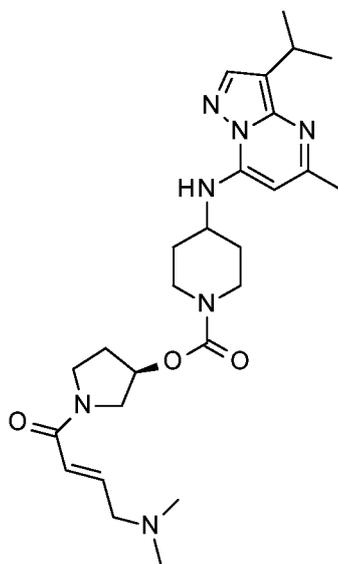
или его фармацевтически приемлемой соли. Особенно предпочтительны соль геми-эдилизат гидрат или соль безилат.

Другой особенно предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению (3S)-1-[(2E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил 4-[[5-метил-3-(пропан-2-ил)пиразоло[1,5-А]пиримидин-7-ил]амино} пиперидин-1-карбоксилату:



(II)

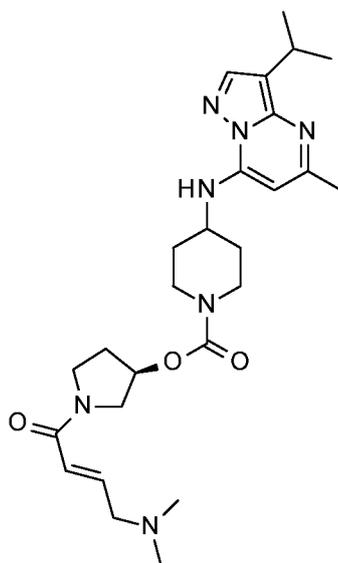
Дополнительный особенно предпочтительный вариант реализации данного изобретения относится к соединению, (3R)-1-[(2E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил 4-{[5-метил-3-(пропан-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил]амино}пиперидин-1-карбоксилату (как показано на (III) ниже):



(III)

или его фармацевтически приемлемой соли. Особенно предпочтительны соль геми-эдилизат гидрат или соль безилат.

Другой особенно предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению (3R)-1-[(2E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил 4-{[5-метил-3-(пропан-2-ил)пиразоло[1,5-А]пиримидин-7-ил]амино}пиперидин-1-карбоксилату:



(III)

Соединения по данному изобретению, как правило, эффективны в широком интервале доз. Например, суточные дозы входят в диапазон от около 1 мг до около 2 г. В некоторых случаях более уместными могут быть уровни доз, находящиеся ниже нижнего предела указанного диапазона, тогда как в других случаях могут быть использованы более высокие дозы при сохранении благоприятного профиля пользы/риска, и, следовательно, вышеуказанный диапазон доз никоим образом не предназначен для ограничения данного изобретения. Следует понимать, что количество фактически введенного соединения определяет врач с учетом релевантных обстоятельств, включая подлежащее лечению патологическое состояние, выбранный способ введения, фактически вводимое соединение или соединения, возраст, массу и ответ конкретного пациента, а также тяжесть симптомов пациента.

Отдельные изомеры и энантиомеры могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений по изобретению такими способами, как методики селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, *и др.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel и S.H. Wilen," *Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

Кроме того, определенные промежуточные соединения, описанные в данном документе, могут содержать одну или более защитную группу. Переменные защитные группы могут быть в каждом случае одинаковыми или различными, в зависимости от конкретных условий реакции и конкретных проводимых превращений. Условия постановки защиты и снятия защиты хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в литературных источниках (см., например, "Greene's Protective Groups

in Organic Synthesis”, четвертое издание, Peter G.M. Wuts и Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007)

Некоторые аббревиатуры определены следующим образом: «¹H ЯМР» обозначает ¹H-ядерный магнитный резонанс; «экв.» обозначает эквивалент; «ТГФ» обозначает тетрагидрофуран; «ДХМ» обозначает дихлорметан; «MeCN» или «ACN» обозначает ацетонитрил; «ДМСО» обозначает диметилсульфоксид; «МТБЭ» обозначает метил-трет-бутиловый эфир; «ТЭА» обозначает триметиламин; «НАТУ» обозначает 1-[бис(диметиламино)метиле]-1-Н-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид гексафторфосфат; «MeOH» обозначает метанол; «ТСХ» обозначает тонкослойную хроматографию; «УФ» обозначает ультрафиолет; «Колонка ЖХ» обозначает колонку жидкостной хроматографии; «ДМЭА» обозначает диметилметиламин; «EtOAc» обозначает этилацетат; «ДМФА» обозначает диметилформаид; «СКО» обозначает сильный катионный обмен; «ок» обозначает около или приблизительно; «КДК» обозначает круглодонную колбу; «АТФ» обозначает аденозинтрифосфат; «ДТТ» обозначает дитиотреитол; «HEPES» обозначает (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислоту); «ЭДТА» обозначает этилендиаминтетрауксусную кислоту; «АТСС» обозначает Американскую коллекцию типовых культур; «КТ» обозначает комнатную температуру; «ФСБ» обозначает забуференный фосфатом солевой раствор; «БСА» обозначает альбумин бычьей сыворотки; «ФСБС» обозначает фетальную бычью сыворотку; «РНКаза» обозначает рибонуклеазу; «кДНК» обозначает комплементарную ДНК; «GST» обозначает глутатион-S-трансферазу; «His» обозначает гистидин; «GSH» обозначает глутатион; и «HBSS» обозначает сбалансированный солевой раствор Хэнка.

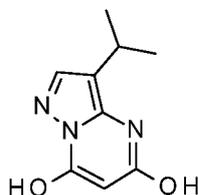
Соединения по данному изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут быть получены посредством многочисленных способов, известных в данной области техники, а также Получений и Примеров, описанных ниже. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно объединять различным образом или объединять со стадиями из других схем для получения соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей. Продукты каждой стадии на приведенных ниже схемах можно выделять традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, упаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. Указанные реагенты и исходные материалы легко доступны специалистам в данной области техники.

Следующие способы синтеза и примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение и представляют собой типичный синтез соединений по данному изобретению.

Получения и Примеры

Получение 1

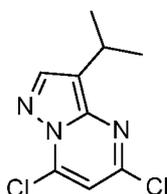
Синтез 3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-5,7-диола.



Добавляли этилат натрия (979 г, 14,4 моль, 3,0 экв.) и диэтилмалонат (998 г, 6,23 моль, 3,0 экв.) при 23 °С к раствору 4-изопропил-1Н-пиразол-3-амина (600 г, 4,79 моль) в этаноле (4,2 л) и смесь нагревали до 80 °С (внутренняя температура) в течение 15 часов. Смесь охлаждали до 25 °С, добавляли 1 М водный раствор HCl (2,0 л) (конечный pH = 2,0), фильтровали, промывали твердое вещество водой (2,0 л) и сушили с получением 3-изопропилпиразоло[1,5-а]пиримидин-5,7-диол (600 г, 65 %) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 194 (M+H).

Получение 2

Синтез 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидина.



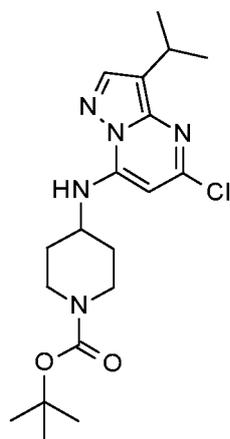
Добавляли POCl_3 (2,00 л, 25,8 моль, 10 экв.) и N,N-диметиланилин (162 мл, 2,58 моль, 1,0 экв.) к суспензии 3-изопропилпиразоло[1,5-а]пиримидин-5,7-диола (500 г, 2,58 моль) в MeCN (1,25 л) при 50 °С и смесь нагревали до 100 °С в течение 36 часов. Охлаждали до 23 °С, по каплям выливали в 1:1 лед/фосфатный буфер (1 М, pH = 8, 10 л) и перемешивали в течение 15 часов. Фильтровали, промывали твердое вещество водой (5,0 л) и сушили с получением 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидина (375 г, 63 %) в виде коричневого твердого вещества. ИЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 230/232 [M+H]. ^1H ЯМР (d_6 -ДМСО) δ 1,32 (д, 6H), 3,19 (дк, 1H), 7,58 (с, 1H), 8,31 (с, 1H).

Альтернативный способ синтеза 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидина.

Добавляли этилат натрия (21 % в этаноле) (17,9 мл, 47,9 ммоль) к раствору 4-изопропил-1H-пиразол-5-амина (5 г, 39,9 ммоль) и диэтилмалоната (6,74 мл, 43,9 ммоль) в этаноле (150 мл) и перемешивали при комнатной температуре. Через 5 минут нагревали до 90 °С и перемешивали. Через 18 часов охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Растворяли остаток в воде и добавляли 1 N соляную кислоту до pH=3. Отфильтровывали белый осадок и сушили при пониженном давлении при 50 °С в течение 18 часов. Полученный твердый 3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-5,7-диол (4,92 г, 25,5 ммоль, 0,638) суспендировали в оксихлориде фосфора (48 мл) и добавляли N,N-диметиланилин (2,3 мл). Смесь кипятили с обратным холодильником при 110 °С. Через 2 часа охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Выливали остаток в лед/водный раствор и экстрагировали ДХМ (дважды). Объединяли органические слои, промывали солевым раствором и сушили над сульфатом магния. Фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя смесью этилацетат:гексан с получением 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидина (4,45 г, 19,3 ммоль) в виде коричневого твердого вещества. МС (m/z): 230,232 (M+1). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 8,31 (с, 1 H), 7,58 (с, 1 H), 3,19 (м, 1 H), 1,32 (д, J= 7,0 Гц, 6H).

Получение 3

Синтез трет-бутил 4-[(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

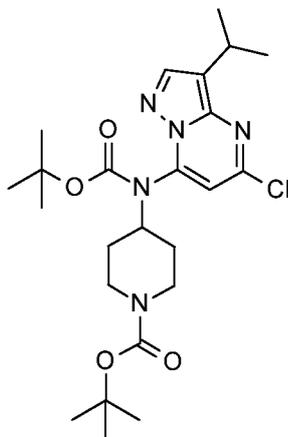


Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (189 мл, 140 г, 1080 ммоль, 2 экв.) и трет-бутил 4-аминопиперидин-1-карбоксилат (114 г, 570 ммоль, 1,05 экв.) к суспензии 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин (130 г, 542 ммоль) в 2-пропанол (1,0 л) при 23 °С и смесь перемешивали в течение 18 часов. Фильтровали, промывали твердое

вещество МТБЭ (200 мл) и сушили с получением трет-бутил 4-[(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (182 г, выход 85 %) в виде желтого твердого вещества. ИЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 394/396 [M+H]. ^1H ЯМР (d_6 -ДМСО) δ 1,28 (д, 6H), 1,42 (с, 9H), 1,61 (м, 2H), 1,83 (м, 2H), 2,87 (м, 1H), 3,10 (дк, 1H), 3,32 (м, 1H), 3,85 (м, 1H), 3,98 (м, 2H), 6,34 (с, 1H), 8,01 (с, 1H), 8,07 (д, 1H).

Получение 4

Синтез 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.



Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (69,1 мл, 51,2 г, 396 ммоль, 1 экв.), 4-диметиламинопиридин (4,84 г, 39,6 ммоль, 0,1 экв.) и ди-трет-бутилдикарбонат (200 мл, 190 г, 871 ммоль, 2,2 экв.) к раствору трет-бутил 4-[(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (156 г, 396 ммоль) в ТГФ (936 мл) при 23 °С и смесь нагревали при 50 °С (внутренняя температура) в течение 21 часа. Охлаждали до 23 °С и упаривали под вакуумом с получением трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (195 г, 99 %) в виде оранжевого твердого вещества. ИЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 438/440 [M+H-56]. ^1H ЯМР (d_6 -ДМСО) δ 1,20 (с, 9H), 1,31 (д, 6H), 1,35 (с, 9H), 1,46 (м, 2H), 1,88 (м, 2H), 2,75 (м, 1H), 3,19 (дк, 1H), 3,32 (м, 1H), 3,95 (м, 1H), 4,18 (м, 2H), 7,20 (с, 1H), 8,19 (с, 1H).

Альтернативный способ синтеза 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

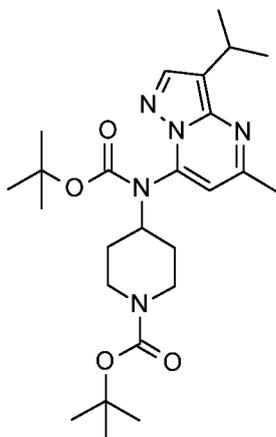
Добавляли трет-бутил 4-аминопиперидин-1-карбоксилат (2,8 г, 14 ммоль) к раствору 5,7-дихлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидина (3,1 г, 13 ммоль) в этаноле (32 мл). Нагревали при 80 °С. Через 18 часов охлаждали до комнатной температуры и

упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя смесью этилацетат:ДХМ с получением трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата в виде белого твердого вещества. Масс-спектр (m/z): 394,396 (M+1)

Добавляли трет-бутоксикарбонил трет-бутил карбонат (1,14 г, 5,22 ммоль) к раствору трет-бутил 4-[(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (940 мг, 2,386 ммоль) и 4-диметиламинопиридина (290 мг, 2,33 ммоль) в ТГФ (7 мл). Смесь нагревали при 60 °С. Через 30 минут охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя ДХМ с получением трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (1,1 г) в виде желтоватого масла. Масс-спектр (m/z): 438 (M-t-Bu). ¹H ЯМР (400,13 МГц, d₆-ДМСО): 8,19 (с, 1H), 7,20 (с, 1H), 5,76 (с, 1H), 4,17(м, 1H), 3,95 (м, 2 H), 3,19 (м, 1 H), 1,87 (м, 2 H), 1,47 (м, 2 H), 1,35 (с, 9 H), 1-31 (д, 6H), 1,19 (с, 9H).

Получение 5

Синтез трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

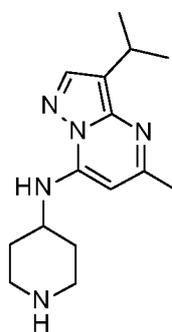


Добавляли аддукт ДХМ [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия (II) (15,7 г, 19,3 ммоль, 0,05 экв.), трехосновный фосфат калия (245 г, 1160 ммоль, 3 экв.) и 2,4,6-триметил-1,3,5,2,4,6-триоксатриборинан (50 мас. % в ТГФ, 75,3 мл, 67,6 г, 270 ммоль, 0,7 экв.) к раствору трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (190 г, 385 ммоль) в 1,4-диоксане (1,5 л) при 90 °С (внутренняя температура). Через 5 дней охлаждали до 23 °С, фильтровали через слой диатомовой земли и промывали твердое вещество ТГФ (3 × 250 мл). Объединенные фильтраты обрабатывали Тиоловой смолой SiliaMetS® при 23 °С

(40-63 мкм; загрузка = 1,46 ммоль/г; 320 г, 467 ммоль) и нагревали до 65 °С в течение 18 часов. Охлаждали до 23 °С, фильтровали и смолу промывали ДХМ (2 x 250 мл). Объединенные фильтраты упаривали под вакуумом, растворяли остаток в МТБЭ (1 мл), промывали водой (200 мл), сушили (MgSO₄) и упаривали под вакуумом с получением трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (182 г, 100 %) в виде коричневого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 474 (M+H).

Получение 6

Синтез 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин дигидрохлорида.



2 HCl

Добавляли соляную кислоту в 2-пропаноле (5,50 моль/л, 349 мл, 1920 ммоль, 5 экв.) к суспензии трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (182 г, 384 ммоль) в 2-пропаноле (1,4 л) при 23 °С и смесь нагревали до 70 °С (внутренняя температура) в течение 3 часов. Охлаждали до 23 °С, фильтровали, промывали твердое вещество МТБЭ (2 x 200 мл) и сушили с получением 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин дигидрохлорида (95 г, выход 71 %) в виде желтого твердого вещества. Объединяли маточные растворы, разбавляли МТБЭ (2 л), фильтровали, промывали твердое вещество МТБЭ (2 x 50 мл) и сушили с получением дополнительного материала (8,42 г, выход 15 %). ИЭР/МС (m/z): 274 (M+H). ¹H ЯМР (d₆-DMCO) δ 1,28 (д, 6H), 2,04 (м, 4H), 2,61 (с, 3H), 3,00 (м, 2H), 3,40 (м, 3H), 4,16 (м, 2H), 6,68 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 8,80 (м, 1H), 9,21 (м, 1H), 9,86 (м, 1H).

Альтернативный способ синтеза 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин дигидрохлорида.

Растворяли 7-хлор-3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин (2,1 кг, 10,0 моль) и диизопропилэтиламин (4,18 л, 2,4 экв.) в изопропаноле (16,8 л, 8 мл/г). В реакционную смесь загружали трет-бутил 4-аминопиперидин-1-карбоксилат (2,6 кг, 1,3

экв.) и нагревали до 75-80 °С в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до 5-10 °С и добавляли 4 М раствор соляной кислоты в изопропанол (17,5 л, 7,0 экв.). Нагревали до 40-45 °С в течение 4 часов. Охлаждали до 25-30 °С и смесь фильтровали с получением указанного соединения (2,25 кг, выход 72,7 %). Материал использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ¹Н ЯМР (500 МГц, D₂O) δ 8,16 (с, 1H), 6,45 (с, 1H), 4,29-4,26 (м, 1H), 3,63 (д, J = 15,0 Гц, 2H), 3,26 – 3,12 (м, 3H), 2,64 (с, 3H), 2,40 (д, J = 15,0 Гц, 2H), 2,08 (дд, J = 10,0, 25,0 Гц, 2H), 1,31 (д, J = 5,0 Гц, 6H).

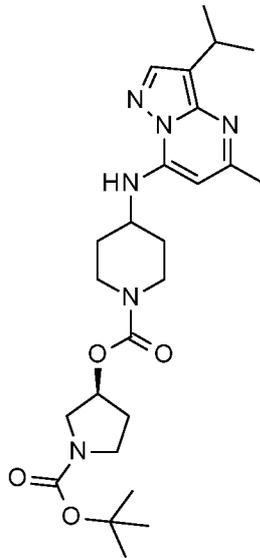
Альтернативный способ синтеза 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амина в виде свободного основания.

Добавляли 1,4-диоксан (15 мл) к смеси трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(5-хлор-3-изопропил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (689 мг, 1,39 ммоль), 2,4,6-триметил-1,3,5,2,4,6-триоксатриборинана (350 мг, 2,79 ммоль) и трехосновного фосфата калия (1,2 г, 5,5 ммоль). Барботировали N₂ через раствор в течение 5 минут. Добавляли аддукт ДХМ [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия (II) (60 мг, 0,072 ммоль). Нагревали при 110 °С. Через 1,5 часа добавляли еще [1,1-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (60 мг, 0,072 ммоль) и нагревали при 100 °С. Через 18 часов охлаждали до комнатной температуры, смесь фильтровали через слой целита, промывали этилацетатом и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя смесью этилацетат:ДХМ с получением трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (537 мг, 1,077 ммоль) в виде оранжеватого масла. Масс-спектр: (m/z): 474 (M+1).

По каплям добавляли трифторуксусную кислоту (2,5 мл, 33 ммоль) к раствору трет-бутил 4-[трет-бутоксикарбонил-(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат (537 мг, 1,077 ммоль) в ДХМ (12 мл). Перемешивали при комнатной температуре. Через 2 часа смесь упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали путем элюирования с помощью картриджа SCX-2 с 10% ДХМ:MeOH, затем MeOH (2 Н NH₃). Упаривали основную фракцию при пониженном давлении с получением 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амина (345 мг, 1,199 ммоль) в виде коричневатого твердого вещества. Масс-спектр (m/z): 274 (M+1). ¹Н ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 7,82 (с, 1H), 7,23 (д, 1H), 6,08 (с, 1H), 3,58 (м, 1H), 3,12 (м, 1H), 2,97 (м, 2H), 2,58 (м, 2H), 2,39 (с, 3H), 2,10 (м, 2H), 1,28 (д, 6H).

Получение 7

Синтез [(3S)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата



Добавляли фосген (20 мас. % в толуоле, 348 мл, 485 г, 981 ммоль, 2,4 экв.) к раствору трет-бутил (3S)-3-гидрокси-пирролидин-1-карбоксилата (76,5 г, 409 ммоль) в ТГФ (765 мл), помещенному в трехгорлую круглодонную колбу, соединенную с бутылкой-ловушкой, содержащей 32 % водный раствор NH_4OH , при 23 °С в течение 1 часа. Барботировали N_2 через данную смесь в течение 30 минут и упаривали под вакуумом. Растворяли остаток в ДХМ (757 мл), охлаждали до 0 °С (внутренняя температура) и добавляли (медленное добавление в течение 7 минут) суспензию 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин дигидрохлорида (94,6 г, 273,2 ммоль) в ДХМ (756,8 мл), предварительно обработанную триэтиламино (228 мл, 166 г, 1639 ммоль, 6 экв.). После добавления удаляли охлаждающую баню и гасили реакционную смесь через 30 минут 35 % водным раствором HCl (20 мл) и 1 М водным раствором HCl (300 мл) (конечный pH = 7). Отделяли органический слой, промывали водой (300 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (300 мл), сушили (MgSO_4) и упаривали под вакуумом. Остаток растворяли (ок. 180 г) в ДХМ (1,5 л), добавляли тиоловую смолу SiliaMetS® (40-63 мкм; загрузка = 1,46 ммоль/г; 10 г, 14,6 ммоль, 140 экв. на основе содержания Pd) при температуре 23 °С, а затем смесь нагревали до 40 °С в течение 2 часов. Фильтровали, промывали смолу ДХМ (2×10 мл) и упаривали объединенные фильтраты под вакуумом с получением [(3S)-1-трет-бутоксикарбонил-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (129 г, 97 %) в виде желтого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 487 (M+H). ^1H ЯМР (d_6 -ДМСО) δ 1,28 (д, 6H), 1,40 (с, 9H), 1,65 (м, 2H),

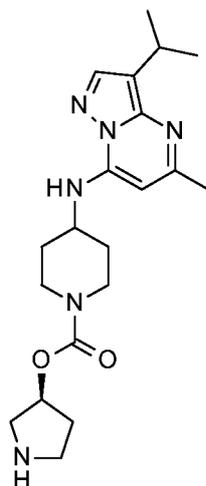
1,88 (м, 2H), 1,96 (м, 1H), 2,07 (м, 1H), 2,46 (с, 3H), 2,90 (м, 2H), 3,31 (м, 5H), 3,89 (м, 1H), 4,02 (м, 2H), 5,10 (м, 1H), 6,32 (с, 1H), 8,01 (с, 1H).

Альтернативный способ синтеза [(3S)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата

Растворяли трет-бутил (3S)-3-гидрокси-пирролидин-1-карбоксилат (438 г, 1,3 экв.) в ацетонитриле (4,4 л, 10,0 мл/г) при 15-30 °С. Добавляли триэтиламин (595 мл, 4,5 экв.) и затем 4-нитрофенилхлорформиат (490 г, 1,4 экв.) при 15-30 °С. Нагревали до 35-40 °С и смесь перемешивали в течение 4 часов. Охлаждали до 15-25 °С и добавляли 3-изопропил-5-метил-N-(пиперидин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин (500 г, 1,8 моль). Перемешивали при 15-30 °С в течение 5 часов. Упаривали при пониженном давлении. Добавляли 2-метилтетрагидрофуран (4,4 л, 10,0 мл/г), перемешивали и фильтровали. Фильтрат промывали последовательно 2 М NaOH (1,1 л, 2,5 мл/г, 4 раза) и насыщенным водным раствором NaCl (4,4 л, 10,0 мл/г). Сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Добавляли изопропиловый спирт (2,2 л, 5 мл/г) с получением раствора указанного соединения (660 г, выход 75,4 %).

Получение 8

Синтез [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.



Добавляли соляную кислоту в 2-пропаноле (5,50 моль/л, 217 мл, 1190 ммоль, 5 экв.) к суспензии [(3S)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (116 г, 239

ммоль) в 2-пропаноле (755 мл) при 23 °С и смесь нагревали до 70 °С в течение 90 минут. Охлаждали до 23 °С и упаривали под вакуумом. Суспендировали остаток в ДХМ (1,5 л), добавляли 1 М водный раствор NaOH (400 мл) и 50% водный раствор NaOH (100 мл). Перемешивали в течение 15 минут. Органическую фазу разделяли, сушили (MgSO₄) и упаривали под вакуумом. Остаток суспендировали (ок. 131 г) в МТБЭ/гексане (2:1, 900 мл) и смесь перемешивали в течение 18 часов. Фильтровали, промывали отфильтрованное твердое вещество гексаном (2 x 100 мл) и сушили с получением [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат (82,7 г, выход 90 %) в виде желтого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 387 (M+H). ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 1,28 (д, 6H), 1,60 (м, 3H), 1,88 (м, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,75 (м, 2H), 2,91 (м, 4H), 3,13 (дк, 1H), 3,78 (м, 1H), 4,02 (м, 2H), 5,10 (м, 1H), 6,14 (с, 1H), 7,41 (д, 1H), 7,87 (с, 1H).

Альтернативный способ синтеза [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

Добавляли 5,5 М соляную кислоту в изопропиловом спирте (8,4 л, 5,0 мл/г) в раствор изопропилового спирта, содержащий (S)-1-(трет-бутоксикарбонил)пирролидин-3-ил 4-((3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино)пиперидин-1-карбоксилат (819 г) при 20-30 °С. Реакционную смесь нагревали до 50-60 °С в течение 5 часов. Охлаждали до 30-35 °С, добавляли МТБЭ (8,2 л, 10 мл/г) и перемешивали в течение 1 часа. Фильтровали, добавляли влажный осадок к водному раствору гидроксида натрия (3,0 экв.) при 0-5 °С и перемешивали в течение 30 минут. Добавляли 2-метилтетрагидрофуран (8,2 л, 10,0 мл/г) и перемешивали. Экстрагировали органическую фазу и промывали насыщенным водным раствором NaCl. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении до 1-2 объемов. Добавляли МТБЭ (2,46 л, 3 мл/г) и перемешивали в течение 3 часов. Фильтровали с получением указанного соединения (550 г). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,82 (с, 1H), 6,12 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 5,78 (с, 1H), 5,27 – 5,13 (м, 1H), 4,26 – 4,01 (м, 2H), 3,74 – 3,59 (м, 1H), 3,36 – 3,23 (м, 1H), 3,14 – 2,98 (м, 5H), 2,90 (дд, J = 11,1, 8,4, 5,4 Гц, 1H), 2,52 (с, 3H), 2,18 – 2,00 (м, 3H), 1,87 (дд, J = 12,6, 6,4 Гц, 1H), 1,76 (с, 1H), 1,66 – 1,52 (м, 2H), 1,34 (д, J = 6,9 Гц, 6H).

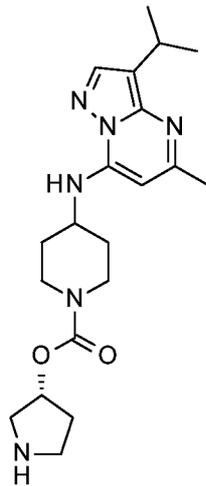
Альтернативный способ синтеза [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

Добавляли фосген (1,14 мл, 20 мас. % в толуоле, 3,20 ммоль) к холодному (0 °С) раствору трет-бутил (3S)-3-гидроксипирролидин-1-карбоксилата (500 мг, 2,67 ммоль) и ТЭА (0,37 мл, 2,6 ммоль) в ТГФ (13 мл). Холодную баню удаляли и смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 30 минут смесь упаривали при пониженном давлении и остаток растворяли в ДХМ (11 мл). Этот раствор добавляли к раствору 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин (С, 365 мг, 100 мас. %, 0,365 г) и ТЭА (0,3 мл) в ДХМ (11 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 10 минут добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 и еще экстрагировали ДХМ. Органические слои объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl , сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя смесью ДХМ:MeOH с получением [(3S)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (671 мг) в виде желтоватого масла. Масс-спектр (m/z): 487 (M+1).

По каплям добавляли трифторуксусную кислоту (2 мл, 26,45 ммоль) к раствору [(3S)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (671 мг, 1,269 ммоль) в ДХМ (12 мл). Перемешивали при комнатной температуре. Через 18 часов смесь упаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ и органическую фазу промывали 10 % водным раствором K_2CO_3 . Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (274 мг, 0,6593 ммоль) в виде белой пены. Масс-спектр (m/z): 387 (M+1). ^1H ЯМР (400,13 МГц, d_6 -DMSO): 7,87 (с, 1H), 7,42 (д, J= 9,0 Гц, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,00 (ддд, J= 9,0, 5,2, 2,5 Гц, 1H), 4,02 (м, 2H), 3,77 (м, 1H), 3,13 (м, 1H), 2,89 (м, 4H), 2,72 (м, 2H), 2,40 (с, 3H), 1,87 (дд, J= 6,8, 14,1 Гц, 2H), 1,63 (м, 3H), 1,28 (д, J= 6,8 Гц, 6H).

Получение 9

Синтез [(3R)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата



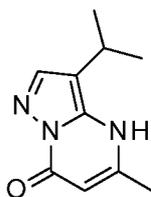
Добавляли фосфен (1,14 мл, 20 мас. % в толуоле, 3,20 ммоль) к холодному (0 °С) раствору трет-бутил (3R)-3-гидрокси-пирролидин-1-карбоксилата (500 мг, 2,67 ммоль) и ТЭА (0,37 мл, 2,6 ммоль) в ТГФ (13 мл). Холодную баню удаляли и смесь перемешивали при комнатной температуре.

Через 30 минут смесь упаривали при пониженном давлении и остаток растворяли в ДХМ (11 мл). Этот раствор добавляли к раствору 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин (365 мг, 100 мас. %, 0,365 г) и ТЭА (0,3 мл) в ДХМ (11 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 10 минут добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 и еще экстрагировали ДХМ. Органические слои объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl , сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель), элюируя смесью гексан:этилацетат с получением [(3R)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (350 мг) в виде желтоватого масла. Масс-спектр (m/z): 487 (M+1).

По каплям добавляли трифторуксусную кислоту (0,8 мл, 0,72 ммоль) к раствору [(3R)-1-трет-бутоксикарбонилпирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (350 мг, 0,72 ммоль) в ДХМ (7 мл). Перемешивали при комнатной температуре. Через 45 минут смесь упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали путем элюирования с помощью картриджа SCX-2 с 10% ДХМ:MeOH, затем MeOH (2 Н NH_3). Упаривали основную фракцию при пониженном давлении с получением [(3R)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (246 мг) в виде коричневатого твердого вещества. Масс-спектр (m/z): 387 (M+1).

Получение 10

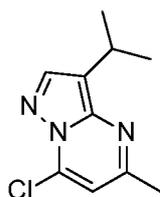
Синтез 3-изопропил-5-метил-4Н-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-она



Растворяли 4-изопропил-1Н-пиразол-5-амин (2,2 кг, 17,6 моль) и этилацетат (2,86 кг, 1,25 экв.) в уксусной кислоте (17,6 л, 8,0 мл/г). Смесь нагревали до 110-115 °С а затем охлаждали до 35-40 °С. Добавляли гептан и МТБЭ (44 л, 20 мл/г, соотношение 5/1). Фильтровали и промывали твердое вещество гептаном (4,4 л, 2 мл/г) с получением указанного соединения (2,28 кг, выход 85,5 %). ¹Н ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 11,81 (с, 1Н), 7,77 (с, 1Н), 5,50 (с, 1Н), 3,08 – 3,05 (м, 1Н), 2,31 (с, 3Н), 1,22 (д, J = 5,0 Гц, 6Н).

Получение 11

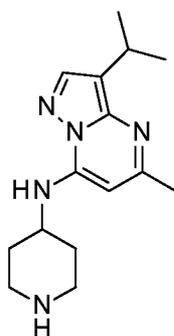
Синтез 7-хлор-3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидина



Растворяли 3-изопропил-5-метил-4Н-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-он (2,1 кг, 11,0 моль) и N,N-диметиланилин (0,86 кг, 0,65 экв.) в ацетонитриле (8,4 л, 4 мл/г). Реакционную смесь нагревали до 50-55 °С и по каплям добавляли POCl₃ (4,2 кг, 2,5 экв.). Температуру регулировали до 60-65 °С и смесь перемешивали в течение 9 часов. Смесь охлаждали до 25-30 °С и выливали в 2 М калий-фосфатный буфер (рН=8,0, 42 л, 20 мл/г). Добавляли МТБЭ (23,9 л, 11,4 мл/г) и экстрагировали органическую фазу. Органическую фазу промывали последовательно 20 % раствором лимонной кислоты (4,2 л, 2,0 мл/г) дважды, 10 % водным раствором NaHCO₃ (10,5 л, 5,0 мл/г) и насыщенным водным раствором NaCl (10,5 л, 5,0 мл/г). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения (1,8 кг, выход 78 %). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,02 (с, 1Н), 6,75 (с, 1Н), 3,27 – 3,25 (м, 1Н), 2,58 (с, 3Н), 1,42 (д, J = 8,0 Гц, 6Н).

Получение 12

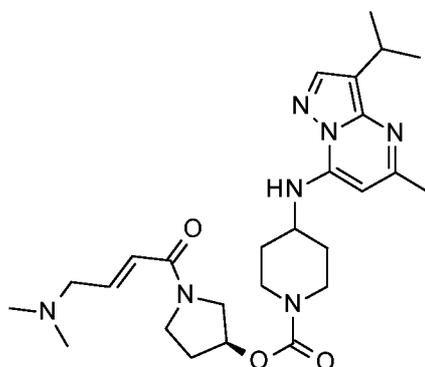
3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин



Добавляли 3-изопропил-5-метил-N-(4-пиперидил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин дигидрохлорид (2,2 кг, 6,4 моль) к 1 М водному раствору гидроксида натрия (19,2 л, 3,0 экв.) при 10-15 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 15-20 минут, затем добавляли 2-метилтетрагидрофуран (4,70 л, 10,0 экв.) и перемешивали в течение 20-25 минут. Органическую фазу отделяли и водную фазу промывали 2-метилтетрагидрофураном (6,6 л, 3,0 мл/г, 3 раза). Объединяли органические растворы и промывали насыщенным водным раствором NaCl (11 л, 5,0 мл/г). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Добавляли МТБЭ (6,6 л, 3,0 мл/г) и перемешивали при 25-30 °С в течение 40 минут. Фильтровали с получением указанного соединения (1,5 кг, выход 85,7 %). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,81 (с, 1H), 6,10 (д, J = 8,0 Гц 1H), 5,75 (с, 1H), 3,59-3,54 (м, 1 H), 3,32-3,28 (м, 1 H), 3,22-3,19 (м, 2 H), 2,77-2,73 (м, 2 H), 2,51 (с, 3H), 2,11 (д, J = 8,0 Гц, 2H), 1,56-1,50 (м, 3 H), 1,34 (д, J = 8,0 Гц, 6H).

Пример 1

Синтез [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.



(II)*

[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 1, хиральный центр изменил ориентацию и форма S энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше

в Примерах в формуле (II).] Добавляли гидрохлорид (E)-4-(диметиламино)бут-2-еновой кислоты (15,0 г, 90,3 ммоль, 1,2 экв.), N,N-диизопропилэтиламин (31,3 мл, 23,4 г, 181 ммоль, 2,4 экв.) и НАТУ (42,9 г, 113 ммоль, 1,5 экв.) к суспензии [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (29,1 г, 75,3 ммоль) в ТГФ (146 мл) при 23 °С и смесь перемешивали в течение 90 минут. Разбавляли фосфатным буфером (0,5 М, pH = 9, 150 мл), экстрагировали ДХМ (2 × 375 мл), сушили (MgSO₄) и упаривали под вакуумом. Полученный остаток очищали (ок. 95 г) хроматографией (загружали остаток, растворенный в 65 мл ДХМ; 330 г SiO₂; элюент: МТБЭ/7 Н NH₃ в MeOH от 0 % до 10 %; ТСХ: МТБЭ/7 Н NH₃ в MeOH 5:1). Материал растворяли (ок. 40 г) в ДХМ (400 мл), промывали 1 М водным раствором K₂HPO₄ (1 М, 80 мл), сушили (MgSO₄) и упаривали под вакуумом. Остаток очищали (ок. 38 г) хроматографией (загружали остаток, адсорбированный на SiO₂ (50 г); 330 г SiO₂; элюент: МТБЭ/7 Н NH₃ в MeOH от 0 % до 10 %) с получением [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (28,1 г, 75 %) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 498 (M+H). ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 1,33 (д, 6H), 1,64 (м, 2H), 2,10 (м, 2H), 2,18 (м, 1H), 2,26 (м, 1H), 2,29 (с, 6H), 2,50 (с, 3H), 3,11 (м, 2H), 3,18 (дд, 2H), 3,29 (дк, 1H), 3,70 (м, 3H), 3,87 (м, 2H), 4,14 (м, 2H), 5,31 (м, 1H), 6,12 (с, 1H), 6,47 (м, 1H), 6,86 (м, 1H), 7,88 (с, 1H). [α]_D²⁰ = +49,9 ° (C=2,0, MeOH). Энантиомерный избыток (ee) = 97 %. R_t (время удерживания) = 2,79 минут (УФ); ЖХ Колонка: CHIRALPAK® AS (4,6 x 150 мм, 5 мкм); MeOH + 0,2 % ДМЭА; Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Альтернативный способ синтеза [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,36 мл, 2,1 ммоль) к раствору [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (170 мг, 0,4091 ммоль), гидрохлорида (E)-4-(диметиламино)бут-2-еновой кислоты (135 мг, 0,81512 ммоль) и НАТУ (317 мг, 0,8181 ммоль) в N,N-диметилформамиде (4 мл). Перемешивали при комнатной температуре. Через 5 минут смесь упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью картриджа SCX-2, элюируя 10% ДХМ:MeOH, затем MeOH (2 Н NH₃). Упаривали основную фракцию при пониженном давлении и остаток очищали с помощью ISCO™ обращенно-фазовой Clariscer C-series элюируя смесью NH₄CO₃ pH 9/ACN с получением

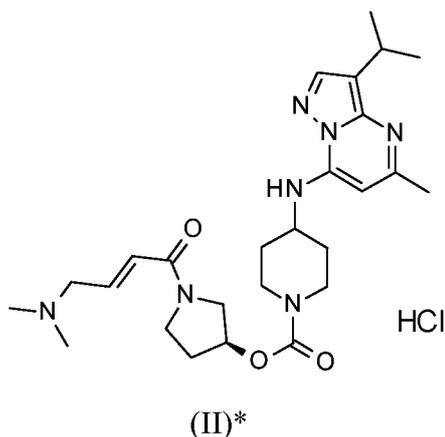
[(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (129 мг, 0,255 ммоль) в виде белого твердого вещества. Масс-спектр (m/z): 498 (M+1). ¹H ЯМР (400,13 МГц, MeOD): 7,88 (с, 1H), 6,85 (м, 1H), 6,47 (м, 1H), 6,12 (с, 1H), 3,91-3,52 (м, 5H), 3,13 (м, 1H), 3,03 (м, 2H), 2,94 (м, 1H), 2,39 (с, 3H), 2,15 (с, 6H), 2,06 (м, 1H), 1,88 (д, J= 11,5 Гц, 2H), 1,66 (м, 2H), 1,28 (д, J= 6,8 Гц, 6H).

Альтернативный способ синтеза [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

Растворяли [(3S)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат (550 г, 1,4 моль) в ТГФ (5,5 л, 10,0 мл/г) при 15-30 °С. Добавляли гидрохлорид (E)-4-(диметиламино)бут-2-еновой кислоты (278 г, 1,2 экв.) и ТЭА (1,17 л, 6,0 экв.) при 15-30 °С и перемешивали в течение 40 минут. Добавляли 50 % пропилфосфонового ангидрида в EtOAc (1,68 л, 1,2 экв.) при 15-30 °С и перемешивали в течение 12 часов. Фильтровали и заменяли растворитель фильтрата на изопропилацетат при пониженном давлении. Добавляли 2 М водный раствор NaOH (2,75 л, 5 мл/г) и перемешивали при 25-30 °С в течение 20 минут. Экстрагировали органическую фазу и промывали насыщенным водным раствором NaCl (2,75 л, 5 мл/г). Сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Добавляли гептан (3,85 л, 7 мл/г) и ТГФ (16,5 л, 3 мл/г) при 15-30 °С. Перемешивали в течение 1 часа и фильтровали с получением указанного соединения (440 г, выход 63,2 %). ¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD) δ 7,86 (с, 1H), 6,83 (д, J = 10,7 Гц, 1H), 6,43 (дд, J = 34,3, 14,9 Гц, 1H), 6,08 (с, 1H), 5,26 (д, J = 24,2 Гц, 1H), 4,85 (с, 2H), 4,22 – 4,01 (м, 2H), 3,90 – 3,76 (м, 2H), 3,61 – 3,47 (м, 1H), 3,36 – 3,21 (м, 2H), 3,17 – 3,11 (м, 2H), 3,12 – 2,98 (м, 2H), 2,47 (с, 3H), 2,28 – 2,21 (м, 7H), 2,16 – 2,00 (м, 3H), 1,68 – 1,48 (м, 2H), 1,30 (д, J = 6,2 Гц, 6H).

Пример 2

Синтез [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат гидрохлорида.

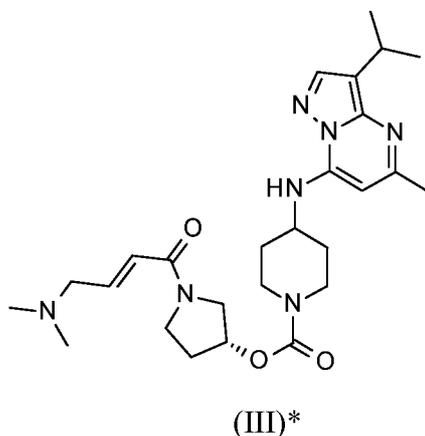


[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 2, хиральный центр изменил ориентацию и форма S энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше в Примерах в формуле (II).] Добавляли HCl (1 М в EtOAc (0,589 мл, 0,590 г, 0,589 ммоль, 1,07 экв.) к раствору [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (0,283 г, 0,549 ммоль) в ацетоне (5,5 мл) при 23 °С и смесь перемешивали в течение 5 часов. Упаривали при пониженном давлении с получением [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат гидрохлорида (0,244 г, 81 %) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 498 (M+H).

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 1,34 (д, 6H), 1,66 (м, 2H), 2,11 (м, 2H), 2,20 (м, 1H), 2,30 (м, 1H), 2,54 (с, 3H), 2,90 (с, 6H), 3,12 (м, 2H), 3,28 (дк, 1H), 3,74 (м, 4H), 3,95 (дд, 2H), 4,16 (м, 2H), 4,63 (м, 1H), 5,32 (м, 1H), 6,22 (с, 1H), 6,78 (м, 2H), 7,94 (с, 1H).

Пример 3

Синтез [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата.

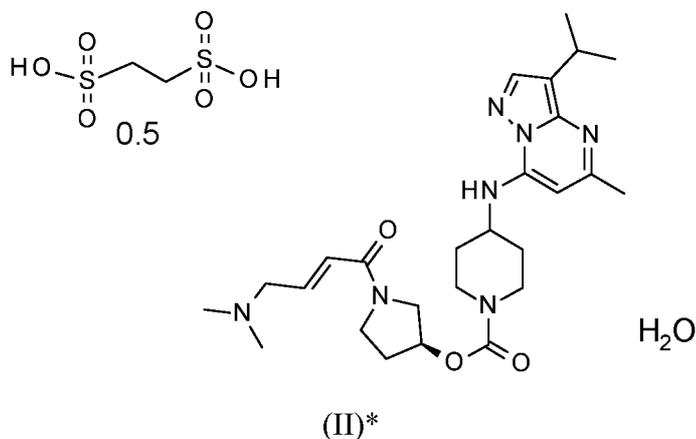


[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 3, хиральный центр изменил ориентацию и форма R энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше в Примерах в формуле (III).] Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,4 мл, 2,0 ммоль) к раствору [(3R)-пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (170 мг, 0,43 ммоль), гидрохлорида (E)-4-(диметиламино)бут-2-еновой кислоты (150 мг, 0,90 ммоль) и HATU (343 мг, 0,87 ммоль) в ДМФА (4 мл). Перемешивали при комнатной температуре. Через 5 минут смесь упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали путем элюирования с помощью картриджа SCX-2 с 10% ДХМ:MeOH, затем MeOH (2 Н NH₃). Упаривали основную фракцию при пониженном давлении и остаток очищали с помощью ISCO™ обращенно-фазовой Clarisep C-series элюируя смесь NH₄CO₃ pH 9/ACN с получением [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (188 мг) в виде белого твердого вещества. Масс-спектр (m/z): 498 (M+1).

¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 7,86 (с, 1 H), 7,41 (м, 1 H), 6,63 (м, 1 H), 6,37 (м, 1 H), 6,13 (с, 1 H), 5,16 (м, 1H), 4,09-3,92 (м, 2H), 3,78 (м, 2 H), 3,56 (м, 2 H), 3,13(м, 1 H), 3,03 (м, 2 H), 2,93 (м, 1 H), 2,39 (с, 3 H), 2,14 (с, 6 H), 2,06 (м, 1 H) 1,88 (м, 2 H), 1,60 (м, 2 H), 1,28 (д, J= 6,8 Гц, 6 H).

Пример 4

Синтез кристаллического [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдилизат гидрата.



[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 4, хиральный центр изменил ориентацию и форма S энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше в Примерах в формуле (II).] Помещали 2,0 г [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-

еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата в 8 мл ацетона при комнатной температуре при перемешивании магнитной мешалкой. В отдельном флаконе растворяли 505 мг гидрата 1,2-этандисульфоновой кислоты в 6 мл ацетона. Добавляли раствор кислоты к раствору свободного основания и перемешивали при комнатной температуре. Перемешивали образец так, чтобы смешивание было тщательным, добавляя дополнительный растворитель для разбавления суспензии, если это необходимо. Суспендировали в течение ночи при 50 °С. После перемешивания в течение ночи оставшуюся густую суспензию белого твердого вещества охлаждали до 20 °С. Выделяли твердые вещества путем вакуумной фильтрации на фильтровальной бумаге и полученный осадок белого твердого продукта сразу сушили на фильтре (2,1 г, выход 88 %).

Диаграммы РПД кристаллического твердого вещества получали на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavor, оснащенный источником CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до 40° 2 θ с шагом 0,008° 2 θ и скоростью сканирования 0,5 секунд/шаг, и с дивергенцией 0,6 мм, с неподвижной 5,28 мм антирассеивающей и 9,5 мм детекторной щелями. Сухой порошок упаковывали в кварцевый держатель образца и обеспечивали гладкую поверхность с помощью предметного стекла. Диаграммы дифракции кристаллической формы получали при комнатной температуре и относительной влажности. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и структура кристалла. Если присутствует влияние предпочтительной ориентации, интенсивности пиков изменяются, но характерные положения пиков полиморфа остаются неизменными. См., например, фармакопею США №23, национальный формуляр №18, страницы 1843-1844, 1995. Дополнительно, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной формы кристалла угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков смещаются из-за изменения температуры или влажности, при которой анализируется образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 \text{ } 2\theta$ учитывает эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков (в единицах ° 2 θ), как правило, более выступающих пиков. Диаграммы дифракции кристаллической формы, записанные при комнатной температуре

и относительной влажности, корректировали по стандартным пикам NIST 675 при 8,853 и 26,774 градуса 2-тета.

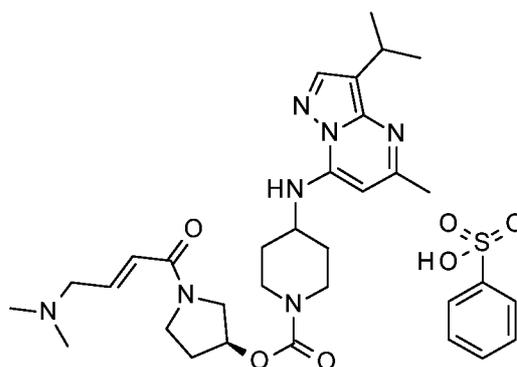
Полученный образец кристаллического геми-эдилизат гидрата характеризовали диаграммой РПД, используя излучение CuKa, как имеющий пики дифракции (значения 2-тета), описанные в таблице ниже, и, в частности, имеющий пик при 18,5° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 21,5°, 16,7° и 15,2°; с допуском для углов дифракции 0,2 градуса.

Пики рентгеновской порошковой дифракции кристаллического геми-эдилизат гидрата

Кристаллический Геми-эдилизат гидрат		
Пик	Угол (°2-тета) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	7,0	14,90 %
2	10,3	36,50 %
3	12,6	14,50 %
4	15,2	47,70 %
5	16,7	58,40 %
6	18,5	100,00 %
7	19,8	16,10 %
8	21,5	63,20 %
9	23,2	17,50 %
10	24,3	10,90 %

Пример 5

Синтез кристаллического [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-a]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилата.



(II)*

[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 5, хиральный центр изменил ориентацию и форма S энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше в Примерах в формуле (II).] Помещали 1998 мг [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата в 15 мл ацетона при перемешивании при 1000 об/мин при комнатной температуре. Добавляли 650 мг бензолсульфоновой кислоты (растворенной в 5 мл ацетона). Перемешивали образец при 1000 об/мин при комнатной температуре в течение одного часа, и через некоторое время раствор становился мутным и образовывалась густая суспензия белого твердого вещества. Выделяли белое твердое вещество выделяли путем вакуумного фильтрования на фильтровальной бумаге. Сушили образец в вакуумной печи в течение 1 часа при 70 °С (2,23 г, выход 85 %).

Синтез кристаллического [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилата.

Растворяли [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат (440 г, 1,1 моль) в EtOAc (1,4 л) и ацетоне (357 мл) при 15-30 °С. Нагревали до 50-55 °С. Растворяли моногидрат бензолсульфоновой кислоты (156 г, 0,89 экв.) в EtOAc (709 мл) и ацетоне (166 мл) и добавляли к реакционной смеси при 5-10 мл/мин при 50-55 °С. Перемешивали в течение 1 часа. Охлаждали до 15-30 °С и перемешивали в течение 12 часов. Фильтровали и сушили влажный осадок в атмосфере азота с получением указанного соединения (525 г, выход 72,9 %). ¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD) δ 7,89 (с, 1H), 7,85 – 7,79 (м, 2H), 7,43 – 7,39 (м, 3H), 6,82 – 6,66 (м, 2H), 6,15 (с, 1H), 5,27 (д, J = 21,5 Гц, 1H), 4,11 (д, J = 32,9 Гц, 2H), 3,94 – 3,79 (м, 4H), 3,33 – 3,18 (м, 2H), 3,10-2,97 (м, 2H), 2,84 (с, 6H), 2,49 (с, 3H), 2,25 – 1,94 (м, 5H), 1,68 – 1,51 (м, 2H), 1,31 (д, J = 6,8 Гц, 6H).

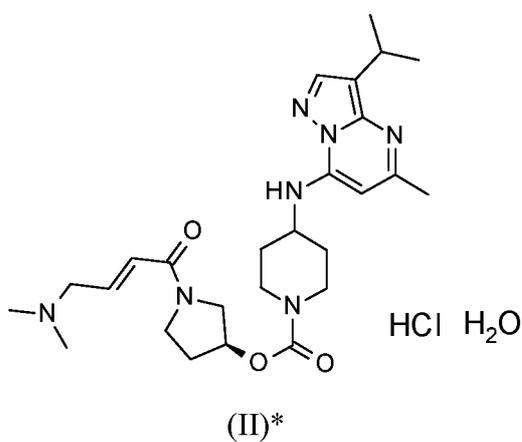
Получали диаграммы РПД кристаллического твердого вещества по существу, как описано в Примере 4. Полученный образец кристаллического безилата характеризовали диаграммой РПД, используя излучение CuKα, как имеющий пики дифракции (значения 2-тета), описанные в таблице ниже, и, в частности, имеющий пик при 21,5° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,4°, 17,3° и 15,8°; с допуском для углов дифракции 0,2 градуса.

Пики рентгеновской порошковой дифракции кристаллического безилата

Кристаллический Безилат		
Пик	Угол ($^{\circ}2\text{-тета}$) $\pm 0,2^{\circ}$	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	6,3	46,30 %
2	9,5	26,30 %
3	10,7	26,30 %
4	12,4	98,70 %
5	15,8	52,00 %
6	16,5	45,20 %
7	17,3	56,60 %
8	21,5	100,00 %
9	23,4	36,80 %
10	24,9	32,10 %

Пример 6

Синтез кристаллического [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-a]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат гидрохлорида.



[*Следует отметить, что, как показано здесь в Примере 6, хиральный центр изменил ориентацию и форма S энантиомера представлена иначе, чем, как показано выше в Примерах в формуле (II).] Помещали 557 мг [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-a]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата в 4 мл ацетона при перемешивании при 1000 об/мин при комнатной температуре. Добавляли 1200 мкл HCl (1 М в этилацетате, 1,07 экв.). Перемешивали образец при 1000 об/мин в течение ночи с получением густой суспензии белого твердого вещества. Выделяли белое твердое вещество выделяли путем вакуумного фильтрования на фильтровальной бумаге. Полученный осадок белого твердого продукта сразу сушили на фильтре в токе воздуха в течение 10 минут (385 мг, выход 64 %).

Получали диаграммы РПД кристаллического твердого вещества по существу, как описано в Примере 4. Полученный образец кристаллического гидрохлорид гидрата характеризовали диаграммой РПД, используя излучение CuKa, как имеющий пики дифракции (значения 2-тета), описанные в таблице ниже, и, в частности, имеющий пик при 18,9° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 5,5°, 15,5° и 9,7°; с допуском для углов дифракции 0,2 градуса.

Пики рентгеновской порошковой дифракции кристаллического гидрохлорида

Кристаллический Гидрохлорид		
Пик	Угол (°2-тета) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	5,5	79,40 %
2	6,2	54,40 %
3	9,2	31,50 %
4	9,7	56,10 %
5	11,1	26,70 %
6	14,2	29,80 %
7	15,5	61,70 %
8	18,9	100,00 %
9	19,5	30,80 %
10	23,4	40,40 %

Биологические Анализы

Следующие анализы демонстрируют, что соединение по данному изобретению является ингибитором активности CDK7. Результаты данных анализов также показывают, что соединение по данному изобретению ингибирует сигнальную систему CDK7 в раковых клетках. Кроме того, соединение по данному изобретению ингибирует пролиферацию в раковых клеточных линиях и рост опухоли в модели ксенотрансплантата опухоли.

«IC₅₀» относится к концентрации агента, которая вызывает 50 % максимального ингибирующего ответа, возможного для данного агента, или, альтернативно, к концентрации агента, которая вызывает 50 % вытеснение специфического связывания лиганда с рецептором; Относительные значения IC₅₀ определяли, используя единицу флуоресценции, путем расчета процентного ингибирования по отношению к встроенным контрольным лункам «MIN» и «MAX», а затем аппроксимировали данные ответа на дозу из десяти точек в логистическое уравнение с четырьмя параметрами.

Анализ Активности Киназы CDK7 и CDK9

Цель данного анализа заключается в измерении способности соединения по данному изобретению ингибировать киназную активность комплекса CDK7/циклин H/Mat1. Чтобы продемонстрировать, проявляют ли соединения, включенные в данное изобретение, какое-либо сродство к CDK7, CDK7 и CDK9, биохимические анализы проводили без предварительной инкубации фермента с указанным соединением или с предварительной предварительной инкубацией в течение 3 часов. Функциональные анализы подтверждают, проявляют ли соединения по данному изобретению способность ингибировать активности киназ CDK7 и CDK9. Все лиганды, растворители и реагенты, используемые в следующих анализах, легко доступны из коммерческих источников или могут быть легко синтезированы специалистом в данной области техники. Определение IC₅₀ для CDK7 и CDK9 определяли следующим образом.

Биохимический анализ на ингибирование CDK7/CyclinH/MAT1

Активность IC₅₀ ингибитора определяли с использованием анализов связывания с радиоактивными метками (FB) с использованием очищенного рекомбинантного фермента человека в присутствии АТФ/[³³P]АТФ и пептидного субстрата. Выбранные концентрации АТФ находятся на уровне или вблизи K_m фермента для АТФ.

Реакции проводили в 96-луночных полистирольных планшетах в конечном объеме 25 мкл на лунку. Смешивали 5 мкл тестируемого соединения в 20 % ДМСО, 10 мкл раствора субстрата (АТФ/³³РАТФ и CDK7/9 tide) и 10 мкл раствора фермента. Раствор субстрата готовили так, что конечная концентрация составляла 100 мкМ АТФ/[³³Р]АТФ (NEN 10 мкКи/мкл, 3000 Ки/ммоль) и 250 мкМ пептида CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO:1)), разведенные в киназном буфере 4 мМ MgCl₂, 0,01 % TRITONTM X-100, 2 мМ DTT и 20 мМ HEPES. Раствор фермента готовили так, что конечная концентрация составляла 1 нМ фермента CDK7/CyclinH/Mat1 [ProQinase 0366-0360-4 Lot 002]), разведенного в киназном буфере. Тестируемые соединения серийно разбавляли 1:3 в 20 % ДМСО, чтобы создать кривую из 10 точек при начальной концентрации 20 мкМ. В качестве верхнего контроля использовали 20 % буфер в ДМСО без тестируемого соединения (полная активность в отсутствие какого-либо ингибитора), 500 мМ ЭДТА использовали для определения уровня фона в отсутствие активности фермента (нижний контроль). После смешивания 5 мкл соединений с 10 мкл раствора фермента планшет инкубировали в течение 0 или 180 минут при 22 °С. По истечении данного времени реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора субстрата и выдерживали в течение 50 минут при 22 °С. Реакцию прекращали добавлением 80 мкл холодного 10 % раствора ортофосфорной кислоты. Фильтровальные пластины (непрозрачные, нестерильные фильтровальные пластины) предварительно промывали 10 мкл 10 % раствора ортофосфорной кислоты в каждую лунку. 100 мкл смеси переносили на фосфоцеллюлозный фильтр и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут. Фильтровальные пластины промывали 200 мкл 0,5 % ортофосфорной кислоты 3 раза на процессоре фильтровальных пластин. Включение ³³Pi (подсчет «имп/мин») определяли путем добавления 80 мкл MICROSCINTTM в каждую лунку и считывания на счетчике через час. Данные обрабатывали с помощью инструмента GENEDATA SCREENER[®]. Данные анализировали с использованием нелинейного логистического уравнения с 4-параметрами (кривая логистическая концентрация-ответ с четырьмя параметрами): $Y = \text{ниж} + [(\text{верх-ниж}) / (1 + (x / IC_{50})^{\text{угол}})]$ где Y = % ингибирования, X = концентрация, обеспечивающая y% ингибирование, ниж = минимальное значение y на кривой, верх. = максимальное значение y на кривой, и угол = крутизна кривой при IC₅₀.
 %Инг. = [(среднее Max- x/ среднее Max – среднее Min)] · 100
 IC₅₀: концентрация соединения, которая уменьшает заданный ответ (связывание лиганда, ответ фермента) на 50 %.

Соединения, описанные в Примерах 1 и 3, показывали IC₅₀ 0,0173 мкМ и 0,0487 мкМ по отношению к CDK7 без предварительной инкубации, соответственно. После 3

часов предварительной инкубации фермента CDK7 с Примерами 1 и 3 они показывали IC_{50} 0,00237 мкМ и 0,00506 мкМ, соответственно. Эти данные показывают, что оба Примера 1 и 3 ингибируют CDK7.

Анализ на ингибирование активности киназы CDK9/CyclinT1:

Активность IC_{50} ингибитора определяли с использованием анализов связывания с радиоактивными метками (FB) с использованием очищенного рекомбинантного фермента человека в присутствии АТФ и пептидного субстрата. Выбранные концентрации АТФ находятся на уровне или вблизи K_m фермента для АТФ. Реакции проводили в 96-луночных полистирольных планшетах в конечном объеме 25 мкл на лунку. Смешивали 5 мкл тестируемого соединения в 20 % ДМСО, 10 мкл раствора субстрата (АТФ/ $[^{33}P]$ АТФ и CDK7/9 tide) и 10 мкл раствора фермента. Раствор субстрата готовили так, что конечная концентрация составляла 100 мкМ АТФ/ $[^{33}P]$ АТФ (NEN 10 мкКи/мкл, 3000 Ки/ммоль) и 200 мкМ пептида CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO:1)), разведенные в киназном буфере 4 мМ $MgCl_2$, 0,0025 % TRITON™ X-100, 1,58 мМ DTT и 15,80 мМ HEPES. Раствор фермента готовили так, что конечная концентрация составляла 7,5 нМ фермента CDK9/cyclinT1 [Prokinase 0371-0345-1 Lot 004)], разведенного в киназном буфере. Тестируемые соединения серийно разбавляли 1:3 в 20 % ДМСО, чтобы создать кривую из 10 точек при начальной концентрации 20 мкМ. В качестве верхнего контроля использовали 20 % буфер в ДМСО без тестируемого соединения (полная активность в отсутствие какого-либо ингибитора), 500 мМ ЭДТА использовали для определения уровня фона в отсутствие активности фермента (нижний контроль). После смешивания 5 мкл соединений с 10 мкл раствора фермента планшет инкубировали в течение 0 или 180 минут при 22 °С. По истечении данного времени реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора субстрата и выдерживали в течение 60 минут при 22 °С. Реакцию прекращали добавлением 80 мкл холодного 10 % раствора ортофосфорной кислоты. Фильтровальные пластины (непрозрачные, нестерильные фильтровальные пластины) предварительно промывали 10 мкл 10 % раствора ортофосфорной кислоты в каждую лунку. 100 мкл смеси переносили на фосфоцеллюлозный фильтр и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут. Фильтровальные пластины промывали 200 мкл 0,5 % ортофосфорной кислоты 3 раза на процессоре фильтровальных пластин. Добавляли 80 мкл MICROSCINT™ в каждую лунку и считывания на сцинтилляционном счетчике через час. Данные обрабатывали с помощью инструмента GENEDATA SCREENER®. Данные анализировали с использованием нелинейного логистического уравнения с 4-параметрами (кривая

логистическая концентрация-ответ с четырьмя параметрами): $Y = \text{ниж} + [(\text{верх-ниж})/1 + (x/IC_{50})\text{угол}]$ где $Y = \%$ ингибирования, $X =$ концентрация, обеспечивающая $y\%$ ингибирование, $\text{ниж} =$ минимальное значение y на кривой, $\text{верх.} =$ максимальное значение y на кривой, и $\text{угол} =$ крутизна кривой при IC_{50} . $\% \text{Инг.} = [(\text{среднее Max} - x / \text{среднее Max} - \text{среднее Min})] \cdot 100$ IC_{50} : концентрация соединения, которая уменьшает заданный ответ (связывание лиганда, ответ фермента) на 50 %. Относительная IC_{50} : концентрация, дающая половину максимального ответа соединения.

Соединения, описанные в Примерах 1 и 3, показывали IC_{50} 5,93 мкМ и 2,45 мкМ по отношению к CDK9 (3 часа предварительной инкубации), соответственно. Эти данные показывают, что Примеры 1 и 3 не сильно ингибируют активность CDK9.

Взяты вместе, эти данные анализов выше, показывают, что соединения Примеров 1 и 3 селективно ингибируют CDK7 по сравнению с CDK9.

Механистические Анализы Клеток CDK7 и CDK9

Цель данных анализов заключается в измерении способности соединений ингибировать сигнальную систему CDK7 и CDK9 в раковых клетках *in vitro*.

Клеточный Анализ Acutem на основе фосфо-карбоксильных терминальных доменов (Rbp2) (Ser2) p-CTD (S2)

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) культивировали в модифицированной среде McCoys's 5A Medium с добавлением 10% ФБС, 1% NaPуг и 1% Pen/Strep и высевали (до конфлюэнтности на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном при плотность 5000 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, 95% относительной влажности (ОВ) и 37 °C) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро клетки дозировали соединениями. Ингибиторы соединений сначала солюбилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6 % ДМСО. Затем готовили серийные разведения соединения (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Клетки дозировали добавлением 50 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для анализа, содержащий прикрепленные клетки со 100 мкл среды, с получением конечной концентрации ДМСО 0,2 % с диапазоном конечной концентрации соединения в диапазоне от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2 % ДМСО, а для минимальной точки использовали контрольное соединение, разведенное до конечной концентрации 0,83 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,2 % ДМСО. После

дозирования соединениями указанные клеточные планшеты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 4 часов. Культуральную среду осторожно удаляли и клетки фиксировали, добавляя 100 мкл 4 % параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки промывали один раз ФСБ и инкубировали с 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для проникновения клеток. Клетки дважды промывали ФСБ (100 мкл/каждый) и блокировали с помощью 100 мкл/лунку 1% БСА/ФСБ в течение 30 минут при комнатной температуре. 50 мкл 1:1000 первичного антитела (Anti-phospho CTD Ser2 Abcam, № кат ab5095-100), разведенного в 1% БСА/ФСБ, добавляли на лунку, планшеты герметично закупоривали и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

На следующий день клетки промывали три раза ФСБ (100 мкл/лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, Козий анти кроличий IgM, ALEXA FLUOR™ 488) в ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки 3X ФСБ (100 мкл/лунку) на лунку добавляли 100 мкл 50 мкг/мл РНКазы и пропидий йодид при разведении 1:1000 в ФСБ. Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (предохраняли от света). Планшеты анализировали на проницаемость на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный микропланшетный цитометр, изготовленный TTP LABTECH LTD], для измерения антифосфокарбоксильного концевых доменов в Серине 2 (pCTD). Анализ изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. pCTD (S2) положительные клетки идентифицируются по средней интенсивности на 500-530 выше порога. Общая интенсивность в 575-640 от пропидия йодида/ДНК используется для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % pCTD-положительных клеток.

IC₅₀ определяли путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Соединения, описанные в Примерах 1 и 3, показывали относительную IC₅₀ >20 мкМ и 3,52 мкМ по отношению к phosphoCTD (S2), соответственно. Эти данные показывают, что оба Примера 1 и 3 не сильно ингибируют CDK9 в клетках.

Клеточный Анализ Acumen на основе фосфо-карбоксильных терминальных доменов (Rbp2) (Ser5) p-CTD (S5)

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) культивировали в модифицированной среде McCoy's 5A Medium с добавлением 10% ФБС, 1% NaPуг и 1% Pen/Strep и высевали (до конfluence на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном при плотности 5000 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, 95% относительной влажности (ОВ) и 37 °C) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро клетки дозировали соединениями. Ингибиторы соединений солибилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6 % ДМСО. Затем готовили серийные разведения соединения (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Клетки дозировали добавлением 50 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для анализа, содержащий прикрепленные клетки со 100 мкл среды, с получением конечной концентрации ДМСО 0,2 % с диапазоном конечной концентрации соединения в диапазоне от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2 % ДМСО, а для минимальной точки использовали контрольное соединение, разведенное до конечной концентрации 0,83 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,2 % ДМСО. После дозирования соединениями указанные клеточные планшеты инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Культуральную среду осторожно удаляли и клетки фиксировали, добавляя 100 мкл 4 % параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки промывали один раз ФБС и инкубировали с 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для проникновения клеток. Снова клетки дважды промывали ФБС (100 мкл/каждый) и блокировали с помощью 100 мкл/лунку 1% БСА/ФБС в течение 30 минут при комнатной температуре. 50 мкл 1:1000 первичного антитела (Anti-phosphoCTD Ser5 Bethyl Laboratories № кат А300-655А), разведенного в 1% БСА/ФБС, добавляли на лунку, планшеты герметично закупоривали и инкубировали в течение ночи при 4 °C.

На следующий день клетки промывали три раза ФБС (100 мкл/лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, Козий анти кроличий IgM, ALEXA FLUOR™ 488) в ФБС в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки 3X ФБС (100 мкл/лунку) на лунку добавляли 100 мкл 50 мкг/мл РНКазы (Sigma) и пропиций йодид при разведении в ФБС. Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (предохраняли от света). Планшеты анализировали на проницаемость на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный микропланшетный цитометр, изготовленный TTP LABTECH LTD], для измерения антифосфокарбоксильного концевых домена в Серине 5 (pCTD). Анализ

изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. pCTD (S5) положительные клетки идентифицируются по средней интенсивности на 500-530 выше порога. Общая интенсивность в 575-640 от пропидия йодида/ДНК используется для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % pCTD-положительных клеток. IC₅₀ определяли путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Соединения, описанные в Примерах 1 и 3, показывали относительную IC₅₀ 0,148 мкМ и 0,198 мкМ по отношению к pCTD Ser5, соответственно. Эти данные показывают, что оба Примера 1 и 3 ингибируют клеточную активность CDK7.

Клеточный Анализ Acumen на основе cMyc

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) культивировали в модифицированной среде McCoy's 5A Medium с добавлением 10% ФБС, 1% NaPуг и 1% Pen/Strep и высевали (до конфлюэнтности на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном при плотности 5000 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, 95% относительной влажности (ОВ) и 37 °C) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро клетки дозировали соединениями. Ингибиторы соединений солибилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6 % ДМСО. Затем готовили серийные разведения соединения (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Клетки дозировали добавлением 50 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для анализа, содержащий прикрепленные клетки со 100 мкл среды, с получением конечной концентрации ДМСО 0,2 % с диапазоном конечной концентрации соединения в диапазоне от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2 % ДМСО, а для минимальной точки использовали контрольное соединение, разведенное до конечной концентрации 0,83 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,2 % ДМСО. После дозирования соединениями указанные клеточные планшеты инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Культуральную среду осторожно удаляли и клетки фиксировали, добавляя 100 мкл 4 % параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки промывали один раз ФБС и инкубировали с 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для проникновения клеток. Снова клетки дважды промывали ФБС (100 мкл/каждый) и блокировали с помощью 100 мкл/лунку 1% БСА/ФБС в течение 30 минут при комнатной температуре. 50 мкл 1:1000 первичного антитела (антитело Anti-c-Myc [Y69] Abcam № кат ab32072), разведенного в 1% БСА/ФБС, добавляли на лунку,

планшеты герметично закупоривали и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день клетки промывали три раза ФСБ (100 мкл/лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, Козий анти кроличий IgM, ALEXA FLUOR™ 488) в ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки 3X ФСБ (100 мкл/лунку) на лунку добавляли 100 мкл 50 мкг/мл РНКазы и пропидий йодид (Invitrogene) при разведении в ФСБ. Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (предохраняли от света). Планшеты анализировали на проницаемость на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный микропланшетный цитометр, изготовленный TTP LABTECH LTD], для измерения антифосфокарбоксильного концевых домена в Серине 5 (pSTD). Анализ изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. pSTD (S5) положительные клетки идентифицируются по средней интенсивности на 500-530 выше порога. Общая интенсивность в 575-640 от пропидия йодида/ДНК используется для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % pSTD-положительных клеток. IC₅₀ определяли путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Соединения, описанные в Примерах 1 и 3, показывали относительную IC₅₀ 0,0828 мкМ и 0,0573 мкМ по отношению к сМус. Эти данные показывают, что оба Примера 1 и 3 ингибируют транскрипцию сМус в клетках НСТ116.

Эксперимент по профилированию селективности: Proqinase WT Profiler

Профиль ингибирования киназы соединением определяли путем измерения значений остаточной активности при четырех концентрациях без повторов в 320 анализах протеинкиназ дикого типа. Соединения тестировали при 20 мкМ, 2 мкМ, 0,2 мкМ и 0,02 мкМ без повторов. Конечная концентрация ДМСО во всех реакционных коктейлях (включая верхний и нижний контроль) составляла 1%.

Анализ Протеинкиназы

Радиометрический анализ протеинкиназы (33PANQINASE® Анализ активности, ProQinase) использовали для измерения киназной активности 320 протеинкиназ. Все анализы киназ проводили в 96-луночном планшете FLASHPLATES™ в реакционном объеме 50 мкл. Реакционный коктейль пипетировали в 4 этапа в следующем порядке:

1. 10 мкл нерадиоактивного раствора АТФ (в Н₂О)

2. 25 мкл смеси буфера для анализа/[γ - ^{33}P]-АТФ
3. 5 мкл тестируемого образца в 10 % ДМСО
4. 10 мкл смеси фермент/субстрат

Анализ для всех протеинкиназ содержит 70 мМ HEPES-NaOH pH 7,5, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ MnCl_2 , 3 мкМ Na-ортованадат, 1,2 мМ DTT, АТФ (переменные количества, соответствующие кажущейся АТФ- K_m соответствующей киназы, см. Таблицу 1), [γ - ^{33}P]-АТФ (ок. 8×10^5 имп/мин на лунку), протеинкиназу (переменные количества; см. Таблицу 1) и субстрат (переменные количества; см. Таблицу 1). Все анализы РКС (кроме анализа РКС-tu и РКС-nu) дополнительно содержат 1 мМ CaCl_2 , 4 мМ ЭДТА, 5 мкг/мл фосфатидилсерина и 1 мкг/мл 1,2-диолеилглицерина. Анализы САМК1D, САМК2А, САМК2В, САМК2D, САМК2G, САМК4, САМКК1, САМКК2, DАРК2, ЕЕF2K, MYLK, MYLK2 и MYLK3 дополнительно содержат 1 мг/мл Кальмодулина и 0,5 мМ CaCl_2 . Анализы PRKG1 и PRKG2 дополнительно содержат 1 мкМ цГМФ. Анализ DNA-РК дополнительно содержит 2,5 мкг/мл ДНК.

Реакционные коктейли протеинкиназы инкубировали при 30 °С в течение 60 минут. Реакцию останавливали с помощью 50 мкл 2% (об./об.) H_3PO_4 , планшеты отсасывали и дважды промывали 200 мкл 0,9% (об./об.) NaCl . Включение ^{33}P (подсчет «имп/мин») определяли с помощью сцинтилляционного счетчика для микропланшетов. Все анализы протеинкиназ выполняли с помощью роботизированной системы BeckmanCoulter BIOMEK[®] 2000/SL. Все протеинкиназы, предоставленные ProQinase, экспрессируются в клетках насекомых Sf9 или в *E. coli* в виде рекомбинантных GST-слитых белков или His-меченых белков, либо в виде полноразмерных, либо ферментативно активных фрагментов. Все киназы получали из кДНК человека и очищали с помощью аффинной хроматографии GSH или иммобилизованного металла. Аффинные метки удаляли из ряда киназ во время очистки. Чистоту протеинкиназ проверяли с помощью окрашивания SDS-PAGE/Coomassie, идентичность проверяли с помощью масс-спектрологии. Киназы от внешних поставщиков (CAR = Carna Biosciences Inc.; INV = Life Technologies (Invitrogen Corporation[™]); MIL = Merck-Millipore (Millipore Corporation[™]), см. Таблицу 1) экспрессируются, очищаются и их качество контролируются данными поставщика. Концентрации ферментов и субстратов для анализов представлены в Таблице 1.

Оценка Необработанных Данных

Для каждой киназы медианное значение числа импульсов в минуту в трех лунках определяли как «нижний контроль» (n=3). Данная величина отражает неспецифическое

связывание радиоактивности с планшетом в отсутствие протеинкиназы, но в присутствии субстрата. Кроме того, для каждой киназы медианное значение числа импульсов в минуту в трех других лунках принимали за «верхний контроль», то есть полную активность в отсутствие какого-либо ингибитора (n=3). Разница между верхним и нижним контролем каждого фермента принимается за 100% активности. Как часть оценки данных, нижний контроль каждой киназы вычитали из верхнего контроля, а также из их соответствующих «составных значений». Остаточную активность (в %) для каждой лунки соединения рассчитывали по следующей формуле: Ост. Активность (%) = 100 X [(сигнал соединения - нижний контроль)/(верхний контроль - нижний контроль)]. Нестандартные значения IC₅₀ рассчитывали с использованием настраиваемой электронной таблицы Excel в сочетании с надстройкой XLFit. Из-за малого количества точек данных (4) XL-Fit вычисляет нестандартную IC₅₀, используя уравнение с четырьмя параметрами, в котором три параметра привязаны к фиксированным значениям.

Уравнение представляет собой:

$$Y=B+((A-B))/[1+(x/C)]^D$$

A: Минимальное значение активности, также известное как Bottom. Фиксировано 0

B: Максимальное значение активности, также известное как Top. Фиксировано 100

C: Точка перегиба кривой

D: Угловой коэффициент Хилла. Фиксировано 1

Y: Зависимая переменная (т. е. то, что вы измеряете как сигнал)

X: Независимая переменная (т. е. то, что вы контролируете, например, доза, концентрация и т. д.)

Способ вычисления нестандартной IC₅₀ состоит в том, чтобы назначать случайные значения параметру C и повторять его итеративно. Затем алгоритм измеряет различия в сумме квадратов невязок и будет искать последовательные последовательные итерации, где изменение невязок сходится. Как только предел сходимости достигнут, решение считается оптимальным и процесс аппроксимации заканчивается.

CDK12 и CDK13 (ProQinase) тестировали по существу, как указано выше, но отдельно при 10 концентрациях (от 2×10⁻⁵ М до 6×10⁻¹⁰ М) с использованием полулогарифмических разведений. Для 10 точек анализ остаточной активности для каждой концентрации и значения IC₅₀ соединения рассчитывали с использованием QUATTRO® WORKFLOW™ V3.1.1. Подходящей моделью для определения IC₅₀ была «сигмоидальная реакция (переменный наклон)» с параметрами «top», зафиксированными на 100%, и «bottom» на 0%. Используемый метод аппроксимации был методом наименьших квадратов. Данные представлены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1

Киназа	Киназа	Конц. Киназы	Конц. АТФ	Субстрат	Субстрат	IC50
Название	Семья	нМ	мкМ	Название	мкг/50 мкл	мкМ
CDK7/СусН/MAT1	CMGC	3,3	3	RBER- CHKtide	2	0,0928
CDK9/СусТ1	CMGC	2,2	1	RBER- CHKtide	2	6,32
CDK1/СусВ1	CMGC	7	1	RBER- CHKtide	2	20,000
CDK2/СусЕ1	CMGC	1,5	1	RBER- CHKtide	1	20,000
CDK4/СусD1	CMGC	3,3	3	RBER- CHKtide	2	2,830
CDK6/СусD1	CMGC	3,2	3	RBER- CHKtide	2	8,079
CDK8/СусС	CMGC	8,3	1	RBER- IRStide	1	10,922
CDK16/СусY	CMGC	3,2	0,3	GSK3(14- 27)	2	9,073
CDK19/СусС	CMGC	30,9	3	RBER- IRStide	2	7,414
CDK12/СусК	CMGC	14,7	0,3	RBER- IRStide	2	14,780
CDK13/СусК	CMGC	29,2	0,3	RBER- CDC25tide	1	20,000

Эти данные показывают, что соединение Примера 1 является крайне селективным для CDK7 из репрезентативной панели киназ.

Анализ Клеточной Пролиферации

Данные в Таблице 2 показывают, что соединение Примера 1 ингибирует пролиферацию и жизнеспособность указанных линий опухолевых клеток. Клеточные

линии высевали при плотности 5000 клеток на лунку в 100 мкл на лунку культуральной среды в белый 96-луночный планшет для культивирования клеток. См. Таблицу 2 для информации о клеточной линии и культуральной среде. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5% CO₂. На следующий день готовили серийное разведение тестируемого соединения, разбавляя соединение 1:3 в ДМСО для 10 точек. Планшет с ДМСО в 1000 раз превышает конечную концентрацию. В дополнение к ингибитору CDK7 колонка только с ДМСО включена в качестве максимального контроля роста и крайняя колонка с 10 мкМ стауроспорина включена в качестве максимального контроля ингибирования роста. Затем готовили планшет с 10-кратным разбавлением, добавляя 2 мкл на лунку из 1000-кратного ДМСО-планшета к 198 мкл на лунку OMEM (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, № кат 31985-070). Клетки обрабатывали указанным соединением путем добавления 11 мкл на лунку из планшета 10X OMEM в клеточный планшет, содержащий 100 мкл на лунку питательной среды для конечной концентрации 1X. Планшеты помещали обратно в инкубатор при 37 °C и 5% CO₂. Через семь дней после добавления соединения планшеты вынимали из инкубатора и оставляли для уравнивания до комнатной температуры. Реагент CELL TITER GLO[®] размораживали при комнатной температуре и затем готовили путем смешивания одного флакона буфера для анализа с одним флаконом субстрата и осторожно взбалтывали для перемешивания. Затем реагент CELL TITER GLO[®] добавляли в клеточный планшет по 100 мкл на лунку и помещали на шейкер Titer Plate со скоростью 2 в течение 15 минут при комнатной температуре. После 15-минутной инкубации на шейкере считывали люминесценцию, 1 секунду на лунку с использованием Wallac VICTOR2[™]. Кривые нелинейной регрессии и сигмоидальной зависимости доза-ответ использовали для расчета концентрации половины максимального ингибирования (IC₅₀) с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 6.

Таблица 2

Клеточная Линия	Гистология	IC ₅₀ (мкМ)	Номер по Каталогу	Информация о Среде
HCT116	Колоректальный Рак	0,04601	ATCC# CCL-247	McCoy's 5A (Gibco 16600) + 10% ФБС (Hyclone SH30071.03)
MCF7	Рак Молочной Железы	0,03201	ATCC# HTB-22	RPMI 1640 с L-Глутамином (Gibco 11875) + 10% ФБС (Hyclone SH30071.03)
HCC1806	Рак Молочной Железы	0,02553	ATCC# CRL-2335	RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
NCI-H460	Рак Легких	0,0479	ATCC# HTB-177	RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
NCI-H446	Рак Легких	0,01419	ATCC# HTB-171	RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 1 мМ Пирувата натрия (Gibco 11360) + 10% ФБС (Hyclone SH30071.03)
A2780	Рак яичников	0,02651	ATCC# CRL-2772	RPMI 1640 с L-Глутамином (Gibco 11875) + 10% ФБС (Hyclone SH30071.03)
SNU-16	Рак желудочного-кишечного тракта	0,02312	ATCC# CRL-5974	RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 1 мМ Пирувата натрия (Gibco 11360) + 10% ФБС (Hyclone SH30071.03)

Эти данные показывают, что соединение Примера 1 ингибирует рост линий раковых клеток *in vitro* из различных гистологий, включая толстую кишку, молочную железу, легкое, яичник и желудок, с зависимостью от дозы.

Модель Ксенотрансплантата Опухоли

Цель данного анализа заключается в измерении уменьшения объема опухоли в ответ на соединение Примера 1. Для оценки эффективности тестируемого соединения *in vivo* использовали несколько моделей ксенотрансплантата опухолей. Вкратце, $5-10 \times 10^6$ опухолевых клеток в смеси 1:1 MATRIGEL® (общий объем 0,2 мл) вводили подкожно самкам бестимусных мышей (Envigo, Harlan laboratories) для большинства моделей ксенотрансплантата опухолей. Альтернативные штаммы мышей использовали для создания ксенотрансплантатов MDAMB468 (NOD SCID Gamma, Jackson), CT26 и EMT6 (BALB/c, Envigo, Harlan Laboratories). После того как опухоли достигали желаемого размера $\sim 300-500 \text{ мм}^3$, животных рандомизировали в группы по 6-8 для исследований

эффективности. Тестируемое соединение вводили через оральный зонд (ПО) при указанных дозах и графиках. Рост опухоли и массу тела контролировали с течением времени для оценки эффективности и признаков токсичности.

Тестируемое соединение составляли в 5 % N-метил-2-пирролидона (НМП) в 1 % гидроксипропилцеллюлозы, 0,25 % полисорбата 80, 0,05 % противовспенивающего агента в очищенной воде (НЕС) и вводили перорально через зонд (конечный объем 0,2 мл) при дозах, указанных в Таблице 4. Тестируемое соединение составляли еженедельно и хранили при 4 °С. Носители вводили контрольным группам в соответствии с графиками, использованными выше, используя объем 0,2 мл на дозу. Мышам вводили дозу через оральный зонд, а образцы опухоли собирали при прекращении и хранили при -80 °С.

Размер опухоли и массу тела регистрировали и анализировали раз в две недели. Кровь собирали с использованием карты DBS (сухое пятно крови) через 2 часа после введения дозы и при прекращении. Опухоли собирали при прекращении исследования, разрезали на 3 секции и либо мгновенно замораживали для анализа белка и экспозиции, либо помещали в RNeasy Lysis Buffer для анализа РНК. Образцы тканей замораживали и хранили при -80 °С.

Соединение Примера 1 демонстрирует значительную противоопухолевую активность на моделях ксенотрансплантата рака человека (Таблица 3).

Таблица 3: Резюме эффективности *in vivo* одиночного агента Примера 1 ($\Delta T/C$) в различных моделях ксенотрансплантата опухолей, протестированных при различных уровнях дозы, как указано.

Модель	Гистология	Мутации	Доза Примера 1 (мг/кг)	График	Ср. $\Delta T/C$
A2780	Яичник	ARID1A	20	QDx35	-41
COLO205	Яичник		20	QDx28	-4
CT26	Колоректальная		20	QDx24	52
EMT6	Молочная железа		20	QDx28	17
H441	Легкое		20	QDx35	0
H460	Легкое	ARID1A	20	QDx35	16
HCC1806	Молочная железа	KMT2C	20	QDx28	-87
HCT116	Колоректальная	KMT2C	25	QDx21	-17
MDAMB468	Молочная железа	ARID1A, RB1	20	QDx28	-91
MIAPACA2	Поджелудочная железа	ARID1A	20	QDx35	10
MKN45	Желудок	KMT2C	20	QDx35	57
MDAMB231	Молочная железа		20	QDx35	-25

Дельта T/C % рассчитывали, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли. Формула представляет собой $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$. Здесь T и C являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. T₀ и C₀ - средние исходные объемы опухолей в данных группах. *: Значимо ($p < 0,05$)

Исследование Биомаркеров

Целью данного исследования является оценка потенциальных прогностических биомаркеров для соединений по данному изобретению.

Линии раковых клеток профилировали для оценки антипролиферативной активности тестируемого соединения *in vitro*. Информация о мутациях, количестве копий и экспрессии генов *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и/или *RB1* в линиях раковых клеток получена из базы данных COSMIC (cancer.sanger.ac.uk) и cBioportal

(<http://www.cbioportal.org/>). Клетки культивировали в культуральной среде и высевали в 96-луночный планшет в 100 мкл/лунку культуральной среды при 5000 клеток/лунку, затем инкубировали при 37 °С, 5% CO₂ в течение ночи. Клетки культивировали с использованием сред и условий рекомендуемых поставщиком, хорошо известных в данной области техники, например, с RPMI 1640 с добавлением или без HEPES и L-глутамин (Thermo SH30255.01) и 1 мМ Пирувата натрия и 10 % ФБС (Gibco № кат 10082). Планшет для промежуточного разведения 1000X готовили путем приготовления 10 мМ рабочего раствора тестируемого образца в ДМСО и выполнения разведений 1:3 в ДМСО для 10 точек. Планшет для дозирования 10X готовили путем добавления 2 мкл из планшета для промежуточного разведения 1000X к 198 мкл ОПТИМЕМ® + 10% ФБС и тщательного перемешивания. Клеточный планшет затем обрабатывали путем добавления 11 мкл из дозирующего планшета 10X в клеточный планшет 100 мкл/лунку для конечной концентрации 1X. Стауроспорин использовали в качестве максимального контроля ингибирования роста в конечной концентрации 5 мкМ. Клеточные планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37 °С, 5 % CO₂. Через семь дней после обработки буфер для анализа Cell Titer-Glo® (Promega № кат G7571) и субстрат вынимали из -20 °С и оставляли для уравнивания до комнатной температуры. Буфер для анализа добавляли к субстрату и осторожно перемешивали. Реагент CELL TITER-GLO® (100 мкл/лунку) добавляли в клеточный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Через 15 минут люминесценцию считывали с помощью планшет-ридера. Данные анализировали в Excel и строили график в GraphPad Prism. Статистический анализ и значение p рассчитывали с использованием непараметрических t-тестов Манна-Уитни с использованием GraphPad Prism.

Резюме данных о пролиферации показано в Таблице 4. Антипролиферативные эффекты тестируемого соединения подразделяются на нечувствительный (IC₅₀ ≥ 1 мкМ), цитостатический (IC₅₀ <1 мкМ и % ингибирования <70 %) или цитотоксический (IC₅₀ <1 мкМ и % ингибирования ≥70 %). Клеточные линии, несущие мутации инактивации или потери функции (LOF) в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*, продемонстрировали значительно более высокий цитотоксический ответ на Пример 1 по сравнению с остальными клеточными линиями в панели (Таблица 5). Напротив, клеточные линии без потери функции демонстрировали более высокий (%) цитостатический ответ в ответ на Пример 1.

Кроме того, ряд моделей ксенотрансплантата опухолей, несущих данные мутации, использовали для оценки эффективности Примера 1 в качестве монотерапии (Таблица 3).

Резюме исследований эффективности и противоопухолевой активности ($\Delta T/C$) показано в Таблице 3. Пример 1 продемонстрировал высокую эффективность на различных моделях опухолей, причем значительные регрессии отмечены на моделях опухолей, содержащих мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C* или *RBI*. Взятые вместе, данные результаты показывают, что инактивирующие мутации в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* представляют потенциальную стратегию отбора пациентов для лечения с помощью Примера 1 при множественных типах рака.

Таблица 4: Резюме антипролиферативного $\log-GI_{50}$ (нМ) и ингибирования роста (%) Примера 1 в различных линиях раковых клеток, как указано. Клеточные линии обрабатывали в течение 7 дней и анализировали с использованием анализа CellTiter-Glo®.

Клеточная Линия	Информация о Среде	Гистология	Антипролиферативный эффект			LOF Мутации в Гене(генах)			
			IC ₅₀ (мкМ)	% Инг.	Результат	<i>ARID1A</i>	<i>KMT2C</i>	<i>KMT2D</i>	<i>RBI</i>
22RV1	A	ПРОСТАТА	0,028	77	Цитотоксический	Да			
A2058	B	КОЖА	0,030	97	Цитотоксический				Да
A2780	C	ЯИЧНИК	0,052	74	Цитотоксический	Да			
A375	B	КОЖА	0,055	86	Цитотоксический				
A549	D	ЛЕГКОЕ	0,139	64	Цитостатический				
A673	B	КОСТИ	0,014	96	Цитотоксический				
AN3CA	E	ЭНДОМЕТРИЙ	0,050	67	Цитостатический	Да			
AZ521	F	ЖЕЛУДОК	0,036	76	Цитотоксический				
BT20	B	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,373	45	Цитостатический				
C33A	F	ЭНДОМЕТРИЙ	0,014	79	Цитотоксический	Да		Да	
CACO2	B	КИШКИ	0,189	60	Цитостатический				
CAOV3	B	ЯИЧНИК	0,019	96	Цитотоксический		Да		Да
CCRFCEM	C	КРОВЬ	0,040	96	Цитотоксический				
COLO201	C	КИШКИ	0,123	61	Цитостатический				
COLO320	C + 0,8 мкг/мл Пуромицина	КИШКИ	0,189	73	Цитотоксический				
CORL311	C	ЛЕГКОЕ	0,095	75	Цитотоксический				
CORL88	C	ЛЕГКОЕ	4,200	34	Нечувствительный				Да
COV318	C	ЯИЧНИК	>10	40	Нечувствительный				

CT26	C + 0,8 мкг/мл Пуромидин а	КИШКИ	>10	-47	Нечувстви тельный				
DMS114	C	ЛЕГКОЕ	0,014	65	Цитостаги ческий				
DMS273	G	ЛЕГКОЕ	0,019	80	Цитотокси ческий				Да
DMS53	C	ЛЕГКОЕ	0,118	66	Цитостаги ческий				
DMS79	C + 0,8 мкг/мл Пуромидин а	ЛЕГКОЕ	0,354	50	Цитостаги ческий				Да
DU145	F	ПРОСТАТА	0,036	74	Цитотокси ческий		Да		Да
EBC1	C + 1 мкг/мл Пуромидин а	ЛЕГКОЕ	0,047	83	Цитотокси ческий				
EGL1	H		0,041	95	Цитотокси ческий				
EVSAT	G + 2 мкг/мл Пуромидин а	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,040	79	Цитотокси ческий				Да
GL261	C	ГОЛОВНОЙ МОЗГ	0,038	85	Цитотокси ческий				
HCC1143	C	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	>10	37	Нечувстви тельный		Да		
HCC1187	I	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,027	73	Цитотокси ческий				Да
HCC1569	C	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,067	45	Цитостаги ческий				Да
HCC1806	C	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,014	99	Цитотокси ческий		Да		
HCC2218	C	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,560	41	Цитостаги ческий				Да
HCC4006	C	ЛЕГКОЕ	0,028	57	Цитостаги ческий				
HCC44	C	ЛЕГКОЕ	0,131	48	Цитостаги ческий				
HCC70	I	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,038	89	Цитотокси ческий				Да
HCC827	C	ЛЕГКОЕ	0,055	69	Цитостаги ческий				
HCT116	J	КИШКИ	0,041	88	Цитотокси ческий		Да		
HCT8	C	КИШКИ	0,981	3	Цитостаги ческий				
HES108	F	ЭНДОМЕТР ИЙ	0,031	90	Цитотокси ческий	Да	Да		
HES1A	J	ЭНДОМЕТР ИЙ	0,162	56	Цитостаги ческий	Да	Да		
HER3B217	F	ПЕЧЕНЬ	0,033	66	Цитостаги ческий				Да
HERG2	F	ПЕЧЕНЬ	0,028	78	Цитотокси ческий				
HEYA8	C	ЯИЧНИК	0,112	89	Цитотокси ческий	Да	Да	Да	
HGC27	F	ЖЕЛУДОК	0,068	78	Цитотокси ческий				
HL60	C	КРОВЬ	0,045	87	Цитотокси ческий				
HLE	B	ПЕЧЕНЬ	0,030	77	Цитотокси ческий		Да		Да
HLF	B	ПЕЧЕНЬ	0,017	100	Цитотокси ческий		Да		Да

HOS	C	КОСТИ	0,090	72	Цитотоксический		Да		
HS294T	K	КОЖА	0,020	84	Цитотоксический				
HS766T	L	ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,062	72	Цитотоксический	Да			
HT	C	КРОВЬ	0,131	64	Цитостатический				
HT1197	E	МОЧЕВАЯ	0,281	55	Цитостатический	Да		Да	
HUN1	M	ПЕЧЕНЬ	0,128	72	Цитотоксический	Да			
HUN28	A	БИЛИАРНАЯ	2,896	32	Нечувствительный	Да			Да
HUN7	N	ПЕЧЕНЬ	0,175	64	Цитостатический				
IGROV1	C	ЯИЧНИК	0,072	70	Цитотоксический	Да	Да		
IMR32	O	ЦНС	0,002	100	Цитотоксический	Да			
JHN4	B	ПЕЧЕНЬ	0,166	65	Цитостатический				
JHN7	C	ПЕЧЕНЬ	0,027	88	Цитотоксический				
JURKAT	P	КРОВЬ	0,061	98	Цитотоксический	Да	Да		
K562	C	КРОВЬ	>10	-191	Нечувствительный				
Karpas1106	C	КРОВЬ	0,026	98	Цитотоксический				
KARPAS299	C	КРОВЬ	0,069	78	Цитотоксический				
KE97	C	КРОВЬ	0,158	58	Цитостатический				
KELLY	C	ЦНС	0,058	80	Цитотоксический				
KLE	Q	ЭНДОМЕТРИЙ	0,028	65	Цитостатический		Да		Да
KP4	L	ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,036	65	Цитостатический				
KPL1	G + 2 мкг/мл Пурамицина	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,668	43	Цитостатический				
KURAMOCHI	C	ЯИЧНИК	0,052	88	Цитотоксический				
KYSE150	R	ПИЩЕВОД	0,042	64	Цитостатический				
KYSE180	C	ПИЩЕВОД	0,103	68	Цитостатический				
KYSE270	R	ПИЩЕВОД	>10	-180	Нечувствительный				Да
KYSE30	S	ПИЩЕВОД	0,076	76	Цитотоксический				
KYSE520	C	ПИЩЕВОД	>10	50	Нечувствительный				
KYSE70	C	ПИЩЕВОД	0,126	70	Цитотоксический	Да			
LI7	M	ПЕЧЕНЬ	0,132	76	Цитотоксический				
LN18	T	ЦНС	0,015	91	Цитотоксический		Да		
LN229	T	ЦНС	0,036	63	Цитостатический				
LNCAP	P	ПРОСТАТА	0,059	74	Цитотоксический	Да	Да		

LS411N	C	КИШКИ	1,000	45	Нечувствительный	Да	Да		
M14	L	КОЖА	0,032	85	Цитотоксический	Да			
MCF7	F	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,155	58	Цитостатический				
MDAMB157	P	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,866	39	Цитостатический				
MDAMB231	U	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	2,816	23	Нечувствительный				
MDAMB453	U	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,039	56	Цитостатический				
MDAMB468	B	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,008	100	Цитотоксический	Да			Да
MDARCA2B	U	ПРОСТАТА	6,273	17	Нечувствительный		Да		
MDST8	B	КИШКИ	0,049	88	Цитотоксический				
MHCC97H	V	ПЕЧЕНЬ	0,243	59	Цитостатический				
MHCC97L	V	ПЕЧЕНЬ	0,526	45	Цитостатический				
MKN1	C	ЖЕЛУДОК	0,023	80	Цитотоксический				
MKN45	C	ЖЕЛУДОК	0,056	79	Цитотоксический	Да			
MKN7	C	ЖЕЛУДОК	>10	39	Нечувствительный			Да	
MKN74	C	ЖЕЛУДОК	0,073	71	Цитотоксический				Да
MOLT4	C	КРОВЬ	0,040	99	Цитотоксический		Да	Да	
MX1	C	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,045	72	Цитотоксический				Да
NCIH1048	W	ЛЕГКОЕ	0,004	95	Цитотоксический		Да		Да
NCIH1092	C	ЛЕГКОЕ	0,683	42	Цитостатический				
NCIH1155	B	ЛЕГКОЕ	0,043	51	Цитостатический				Да
NCIH1299	A	ЛЕГКОЕ	0,195	44	Цитостатический				
NCIH1436	C	ЛЕГКОЕ	0,195	56	Цитостатический	Да			
NCIH146	C + 0,8 мкг/мл Пурамицина	ЛЕГКОЕ	0,030	77	Цитотоксический				Да
NCIH1666	C	ЛЕГКОЕ	0,161	59	Цитостатический				
NCIH1703	C	ЛЕГКОЕ	0,040	92	Цитотоксический				
NCIH1734	C	ЛЕГКОЕ	0,024	76	Цитотоксический				Да
NCIH1975	C	ЛЕГКОЕ	0,021	90	Цитотоксический				Да
NCIH2030	X	ЛЕГКОЕ	5,374	9	Нечувствительный				
NCIH2081	W	ЛЕГКОЕ	0,442	44	Цитостатический			Да	Да
NCIH209	C + 0,8 мкг/мл Пурамицина	ЛЕГКОЕ	0,040	83	Цитотоксический				
NCIH2122	C	ЛЕГКОЕ	0,078	85	Цитотоксический				
NCIH2196	C	ЛЕГКОЕ	0,123	63	Цитостатический				Да

NCIH2228	C	ЛЕГКОЕ	0,276	57	Цитостати ческий				Да
NCIH226	C	ЛЕГКОЕ	1,197	43	Нечувстви тельный				
NCIH2347	C + 0,8 мкг/мл Пуромидин а	ЛЕГКОЕ	0,661	45	Цитостати ческий				
NCIH358	C	ЛЕГКОЕ	0,042	93	Цитотокси ческий				
NCIH441	C	ЛЕГКОЕ	0,014	84	Цитотокси ческий				
NCIH446	C	ЛЕГКОЕ	0,013	95	Цитотокси ческий			Да	Да
NCIH460	C	ЛЕГКОЕ	0,047	97	Цитотокси ческий	Да			
NCIH520	C	ЛЕГКОЕ	0,082	77	Цитотокси ческий				
NCIH522	C	ЛЕГКОЕ	0,107	50	Цитостати ческий				
NCIH524	C	ЛЕГКОЕ	0,037	92	Цитотокси ческий				Да
NCIH526	C	ЛЕГКОЕ	0,018	94	Цитотокси ческий				
NCIH596	C	ЛЕГКОЕ	0,922	46	Цитостати ческий				Да
NCIH69	C	ЛЕГКОЕ	0,173	68	Цитостати ческий				Да
NCIH727	C	ЛЕГКОЕ	0,117	56	Цитостати ческий				
NCIH82	C	ЛЕГКОЕ	0,699	22	Цитостати ческий				Да
NIHOVAR3	Y	ЯИЧНИК	0,040	96	Цитотокси ческий				
NUGC3	C	ЖЕЛУДОК	0,030	81	Цитотокси ческий	Да	Да	Да	
NUGC4	C	ЖЕЛУДОК	0,019	83	Цитотокси ческий				
OAW42	Z	ЯИЧНИК	0,136	88	Цитотокси ческий	Да			
OCUM1	N	ЖЕЛУДОК	0,027	82	Цитотокси ческий	Да			
OV90	C	ЯИЧНИК	0,034	61	Цитостати ческий				
OVCAR5	Y	ЯИЧНИК	0,086	74	Цитотокси ческий				
OVCAR8	C	ЯИЧНИК	0,065	90	Цитотокси ческий				Да
OZ	AA	ПЕЧЕНЬ	0,050	77	Цитотокси ческий				
PANCI	L	ПОДЖЕЛУД ОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,071	47	Цитостати ческий				
PATU8988 T	C	ПОДЖЕЛУД ОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,201	55	Цитостати ческий				
PLCPRF5	BB	ПЕЧЕНЬ	>10	41	Нечувстви тельный				
Raw264.7	C		0,355	62	Цитостати ческий				
RKO	B	КИШКИ	0,118	61	Цитостати ческий	Да			
RT112	P	МОЧЕВАЯ	0,032	87	Цитотокси ческий				
SAOS2	CC	КОСТИ	0,028	66	Цитостати ческий				Да
SH10TC	C	ЖЕЛУДОК	0,147	58	Цитостати ческий				Да

SHSY5Y	DD	ЦНС	0,059	95	Цитотоксический				
SiHa	F	ЭНДОМЕТРИЙ	0,105	58	Цитостатический				
SJRH30	C	МЯГКИЕ ТКАНИ	0,039	62	Цитостатический				
SKHEP1	BB	ПЕЧЕНЬ	0,118	71	Цитотоксический				
SKMEL28	B	КОЖА	0,098	61	Цитостатический				
SKMES1	F	ЛЕГКОЕ	0,028	80	Цитотоксический			Да	
SKOV3	J	ЯИЧНИК	>10	27	Нечувствительный	Да			
SKUT1	E	МЯГКИЕ ТКАНИ	0,041	89	Цитотоксический	Да			Да
SNU1	C	ЖЕЛУДОК	0,105	68	Цитостатический	Да	Да		
SNU1079	EE	БИЛИАРНАЯ	0,038	89	Цитотоксический	Да			
SNU1196	EE	БИЛИАРНАЯ	0,043	68	Цитостатический				
SNU16	C	ЖЕЛУДОК	0,017	84	Цитотоксический				Да
SNU245	EE	БИЛИАРНАЯ	1,089	-5	Нечувствительный				
SNU308	EE	БИЛИАРНАЯ	0,184	61	Цитостатический				
SNU387	X	ПЕЧЕНЬ	>10	12	Нечувствительный				
SNU398	M	ПЕЧЕНЬ	0,021	85	Цитотоксический				
SNU423	M	ПЕЧЕНЬ	>10	40	Нечувствительный	Да			
SNU449	C	ПЕЧЕНЬ	1,521	8	Нечувствительный	Да			
SNU475	M	ПЕЧЕНЬ	3,917	28	Нечувствительный				
SNU478	EE	БИЛИАРНАЯ	0,032	92	Цитотоксический				Да
SNU5	FF	ЖЕЛУДОК	0,039	79	Цитотоксический	Да			
SNU739	C	ПЕЧЕНЬ	>10	47	Нечувствительный				
SNU869	EE	БИЛИАРНАЯ	0,052	60	Цитостатический				
SW1271	U	ЛЕГКОЕ	0,024	67	Цитостатический				
SW48	U	КИШКИ	0,005	89	Цитотоксический	Да	Да		
SW480	U	КИШКИ	0,036	90	Цитотоксический	Да		Да	
SW626	U		1,105	39	Нечувствительный				
SW780	U	МОЧЕВАЯ	0,074	68	Цитостатический				
SW837	U	КИШКИ	0,068	55	Цитостатический				
SW900	U	ЛЕГКОЕ	3,806	13	Нечувствительный				
T47D	GG	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,045	68	Цитостатический	Да			
T84	HH	КИШКИ	0,308	61	Цитостатический				Да
T98G	O	ЦНС	1,371	44	Нечувствительный				
TCCSUP	E	МОЧЕВАЯ	0,040	61	Цитостатический	Да			

TFK1	П	БИЛИАРНАЯ	0,040	87	Цитотоксический				
TGW	О	ГОЛОВНОЙ МОЗГ	0,070	63	Цитостатический				
THP1	С	КРОВЬ	0,042	81	Цитотоксический				
TOV112D	Л	ЯИЧНИК	0,025	81	Цитотоксический				
TOV21G	С	ЯИЧНИК	0,061	73	Цитотоксический	Да	Да		
TYKNU	О	ЯИЧНИК	0,072	83	Цитотоксический		Да		
U118MG	В	ЦНС	1,170	42	Нечувствительный				
U87MG	О	ЦНС	7,356	-5	Нечувствительный				
UACC812	U	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,076	58	Цитостатический	Да			
UACC893	U	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	4,150	-51	Нечувствительный				Да
UMUC3	Е	МОЧЕВАЯ	0,161	70	Цитотоксический				
ZR751	С	МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА	0,043	69	Цитостатический				

Информация о Среде:

- A. RPMI 1640 (Gibco 11835, Gibco 22400-089, или Nucleon № кат SH30027) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- B. DMEM с L-Глутамином (Thermo № кат SH30022) + NaPyт + NEAA + HEPES + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- C. RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 1 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- D. Среда F-12K (№ кат 30-2004) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- E. EMEM (CellGro № кат 17-305-CV) + L-Глутамин + Пируват натрия + Гидрокарбонат натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- F. EMEM (CellGro № кат 17-305-CV) + L-Глутамин + Пируват натрия + Гидрокарбонат натрия + NEAA + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- G. DMEM (Gibco 11995) + 1 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- H. DMEM с Высоким содержанием глюкозы (Nucleon № кат SH30022) + 10 % ИН ФБС (Gibco № кат 10082) + 1X NEAA (Nucleon SH30328)
- I. Модифицированный ATCC RPMI 1640 (Gibco A1049101) + 1 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- J. McCoy's 5A + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- K. DMEM (Gibco 11965) + 10% ФБС
- L. MEM Eagle с солью Эрла (Gibco 11095-080) + 1% NEAA + 1% NaPyт + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- M. RPMI-1640 с L-глутамином и HEPES + 10 % инактивированной нагреванием ФБС
- N. DMEM с L-глутамином (Thermo № кат SH30022) + Пируват натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- O. MEM (Gibco 11095) + Пируват натрия + NEAA + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- P. RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Thermo SH30255.01 или Gibco 11835) + 1 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- Q. DMEM:F12 с 2,5 мМ L-глутамин, 15 мМ HEPES + 0,5 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС
- R. 49% RPMI 1640 + 49% Ham's F12 + 2% инактивированной нагреванием ФБС
- S. 45% RPMI 1640 + 45% Ham's F12 + 10% инактивированной нагреванием ФБС
- T. DMEM (Gibco 11965) + 1 мМ Пирувата натрия + 5% ФБС (Gibco № кат 10082)
- U. Leibovitz's L15 (Gibco № кат 11415-064) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082), без CO₂
- V. DMEM с высоким содержанием Glu и L-gln + 10% инактивированной нагреванием ФБС + NaPyт + NEAA + HEPES
- W. DMEM:F12 (1:1) + ITS + 10 нМ Гидрокортизона + 10 нМ бета-эстрадиола + 4,5 мМ L-глутамин + 5% ФБС (Gibco № кат 10082)
- X. RPMI-1640 с L-глутамином и HEPES + 10 % ФБС
- Y. RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (Gibco 22400) + 1 мМ Пирувата натрия + NEAA + 20% ФБС (Gibco № кат 10082)
- Z. DMEM + 2 мМ Глутамин + 1 мМ Пирувата натрия (NaPy) + 20 МЕ/л бычьего инсулина + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- AA. Williams' E media (Gibco № кат 12551) + 10% ФБС
- BB. MEM + 10% ФБС + NaPyт + NEAA + HEPES + 1,5 г/л NaHCO₃
- CC. McCoy's 5A (Gibco 16600) + 15% ФБС (Gibco № кат 10082)
- DD. 1:1 MEM (11095): F12 (CellGro 10-080-CV) + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
- EE. RPMI-1640 с глутамином и HEPES (Nucleon № кат SH30255) + 10% ФБС (Gibco № кат 16000) + 1X NaPyт

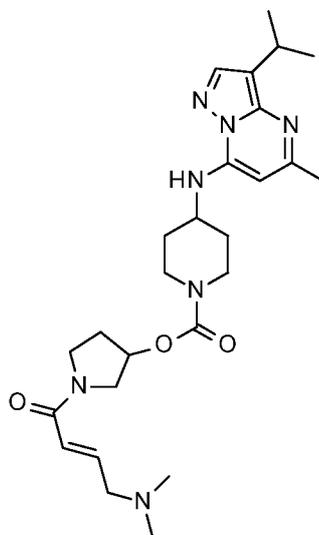
- FF. Среда Дульбекко в модификации Искова с L-глутамином, 25 мМ HEPES [GIBCO 12440-053] + 20% ФБС
 GG. RPMI 1640 с HEPES и L-Глутамином (без фенолового-красного) + 1 мМ Пирувата натрия + 10% ФБС (Gibco № кат 10082)
 HH. 1:1 Hams F12: DMEM + L-Глутамин + 5% ФБС (Gibco № кат 10082)
 II. RPMI-1640 (Hyclone № кат SH30027) + 10% Инактивированной нагреванием ФБС (Gibco № кат 10082)
 JJ. Смесь 1:1 среды MCDB 105 с конечной концентрацией 1,5 г/л гидрокарбоната натрия и среды 199 с конечной концентрацией 2,2 г/л гидрокарбоната натрия + 15% ФБС

Таблица 5: Распределение (%) антипролиферативных эффектов Примера 1 среди линий раковых клеток, несущих мутации LOF.

	Цитотоксический (IC ₅₀ <1 мкМ, % Инг. ≥70)	Цитостатический (IC ₅₀ <1 мкМ, % Инг. <70)	Нечувствительный (IC ₅₀ ≥1 мкМ, % Инг. <70)
Мутанты ARID1A	64%, n=25	23%, n=9	13%, n=5
Мутанты KMT2D	76%, n=19	12%, n=3	12%, n=3
Мутанты KMT2C	70%, n=7	20%, n=2	10%, n=1
Мутанты RB1	54%, n=22	37%, n=15	10%, n=4
Прочее	40%, n=41	44%, n=45	17%, n=17

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

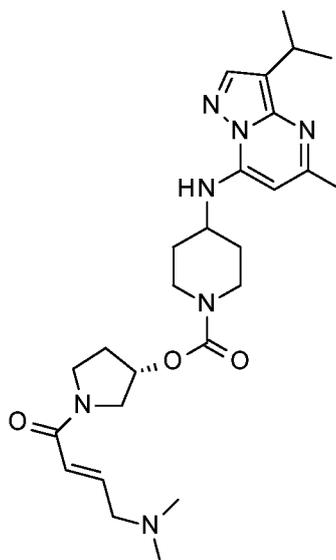
1. Соединение Формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль.

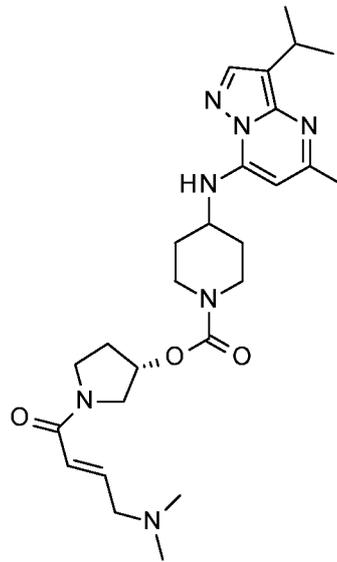
2. Соединение по п. 1 формулы (II)



(II)

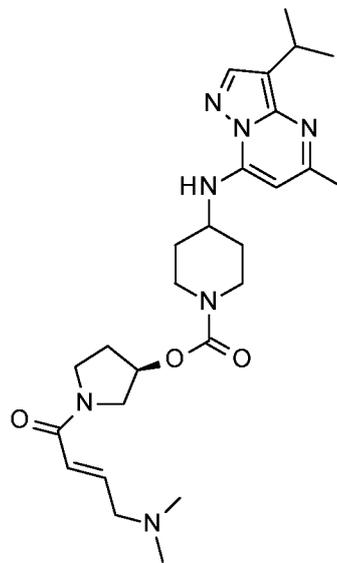
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п. 2 формулы (II)



(II)

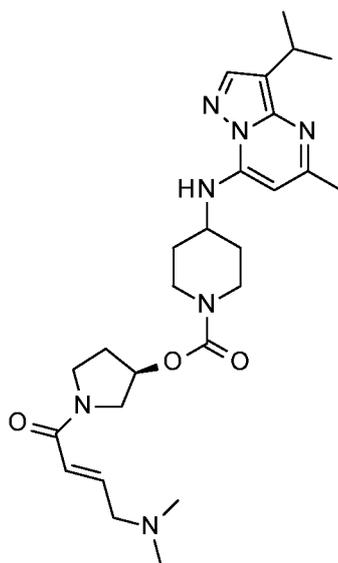
4. Соединение по п. 1 формулы (III)



(III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п. 4 формулы (III)



(III)

6. Соединение или его соль по п. 2, которое представляет собой [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат.
7. Соединение или его соль по п. 2, которое представляет собой [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат.
8. Соединение или его соль по п. 4, которое представляет собой [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат.
9. Соединение или его соль по п. 4, которое представляет собой [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат.
10. Соединение или его соль по пп. 2 или 6, которое представляет собой кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат.

11. Соединение или его соль по п. 10, которое представляет собой кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат, характеризующийся порошковой рентгенограммой с использованием излучения CuKa, имеющей характеристические пики при $2\theta \pm 0,2^\circ$, наблюдаемые при $21,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, включающей $12,4^\circ$, $17,3^\circ$ и $15,8^\circ$.
12. Соединение или его соль по пп. 2 или 7, которое представляет собой кристаллический [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат.
13. Соединение или его соль по п. 12, которое представляет собой [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат, характеризующийся порошковой рентгенограммой с использованием излучения CuKa, имеющей характеристические пики при $2\theta \pm 0,2^\circ$, наблюдаемые при $18,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, включающей $21,5^\circ$, $16,7^\circ$ и $15,2^\circ$.
14. Соединение или его соль по пп. 4 или 8, которое представляет собой кристаллический [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат безилат.
15. Соединение или его соль по пп. 4 или 9, которое представляет собой кристаллический [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат геми-эдизилат гидрат.
16. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-15 или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, содержащая один или более другой терапевтический агент.
18. Способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака или глиом, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, пациенту, нуждающемуся в этом.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника или рак желудка.
20. Способ по пп. 18-19, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак молочной железы.
21. Способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом у пациента, включающий тестирование на наличие по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* в биологическом образце от пациента и введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, пациенту, если тесты указанного образца являются положительными на мутацию с потерей функции.
22. Способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по

любому из пп. 1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, пациенту, если биологический образец от указанного пациента содержит, по крайней мере, одну мутацию с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*.

23. Способ лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичника, рака желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, рака кожи или глиом у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, пациенту, если указанный пациент выбран для лечения если биологический образец от указанного пациента дал положительный результат тестирования на, по крайней мере, одну мутацию с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*.
24. Способ по любому из пп. 18-23, отличающийся тем, что указанное соединение или его соль представляет собой [(3S)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат или его фармацевтически приемлемую соль.
25. Способ по любому из пп. 18-23, отличающийся тем, что указанное соединение или его соль представляет собой [(3R)-1-[(E)-4-(диметиламино)бут-2-еноил]пирролидин-3-ил] 4-[(3-изопропил-5-метил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилат или его фармацевтически приемлемую соль.
26. Способ по любому из пп. 18-25, отличающийся тем, что указанная соль представляет собой безилатную соль.
27. Способ по любому из пп. 18-25, отличающийся тем, что указанная соль представляет собой соль геми-эдизилат гидрат.
28. Способ по любому из пп. 21-27, отличающийся тем, что указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК.
29. Способ по любому из пп. 21-28, отличающийся тем, что указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли пациенту.

30. Способ по любому из пп. 21-29, отличающийся тем, что указанный ген представляет собой ген *ARID1A*.
31. Способ по любому из пп. 21-29, отличающийся тем, что указанный ген представляет собой ген *KMT2C*.
32. Способ по любому из пп. 21-29, отличающийся тем, что указанный ген представляет собой ген *KMT2D*.
33. Способ по любому из пп. 21-29, отличающийся тем, что указанный ген представляет собой ген *RBI*.
34. Соединение или его соль по любому из пп. 1-15 для применения в терапии.
35. Соединение или его соль по любому из пп. 1-15 для применения при лечении рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом.
36. Соединение или его соль для применения по п. 35, где указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак яичника или рак желудка.
37. Соединение или его соль для применения по пп. 35-36, где указанный рак представляет собой рак молочной железы.
38. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-37, дополнительно включающего проведение анализа *in vitro* с применением биологического образца от пациента, определение наличия по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и *RBI*, и введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его соли пациенту, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из генов.
39. Соединение или его соль для применения по п. 38, где указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК.

40. Соединение или его соль для применения по пп. 38-39, где указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли пациенту.
41. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-40, где пациента выбирают для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*.
42. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-40, где пациента выбирают для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2C*.
43. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-40, где пациента выбирают для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2D*.
44. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-40, где пациента выбирают для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *RBI*.
45. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 34-44, где указанное соединение или его соль вводят пациенту при дозе от около 1 мг до 2 г.
46. Применение соединения по любому из пп. 1-15 или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного средства для лечения рака уротелия, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака простаты, гематологических раков, сарком, раков кожи или глиом.
47. Применение по п. 46, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, включающей колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка.
48. Применение по любому из пп. 46-47, дополнительно включающее проведение анализа *in vitro* с применением биологического образца от пациента, определение наличия по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*,

KMT2C, *KMT2D* и *RBI*, и введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его соли пациенту, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из генов.

49. Применение по п. 48, отличающееся тем, что указанный биологический образец представляет собой образец опухоли, и указанный образец анализируют с помощью секвенирования генома/ДНК.
50. Применение по любому из пп. 46-49, отличающееся тем, что указанный образец получают от пациента до первого введения указанного соединения или его соли пациенту.
51. Применение по любому из пп. 46-50, отличающееся тем, что пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*.
52. Применение по любому из пп. 46-50, отличающееся тем, что пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2C*.
53. Применение по любому из пп. 46-50, отличающееся тем, что пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *KMT2D*.
54. Применение по любому из пп. 46-50, отличающееся тем, что пациента выбирают по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *RBI*.
55. Применение по любому из пп. 46-50, отличающееся тем, что указанное соединение или его соль вводят пациенту при дозе от около 1 мг до 2 г.