

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092671** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

(22) Дата подачи заявки
2016.03.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) ОПТИМИЗИРОВАННАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(31) **201510119944.5**

(32) **2015.03.19**

(33) **CN**

(62) **201792066; 2016.03.18**

(71) Заявитель:

**ЧЖЭЦЗЯН ДТРМ БАЙОФАРМА КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

Хэ Вэй (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлены серии новых мультязамещенных фтором пиразолопиримидиновых соединений или солей. Соединения представляют собой ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК). Соединения обладают лучшими избирательностью ингибирования киназы и фармакокинетическими свойствами. Представлен также способ получения соединений. Представлена также комбинированная терапия, включающая в себя соединения в комбинации с композицией другого направленного лекарственного средства или с другим лекарственным средством. Оптимизированная комбинированная терапия оказывает кооперативный эффект, подавляя существующую опухоль лучше, чем однонаправленное лекарственное средство, и вызывает полное исчезновение определенных опухолей. Оптимизированная комбинированная терапия излечивает устойчивость опухоли к лекарственному средству и рецидив злокачественной опухоли лучше, чем однонаправленное лекарственное средство, и цикл лечения является более коротким. Настоящее изобретение также относится к комбинированному соединению и фармацевтическому препарату, где указанное комбинированное соединение действует в качестве активного ингредиента, где указанный фармацевтический препарат является более безопасным в более низких дозах и обладает эффективностью кооперативного эффекта. Представлен также способ применения соединений и их получения для лечения и подавления аутоиммунного заболевания или нарушения, гетерогенного аутоиммунного заболевания или нарушения, воспалительного заболевания, злокачественной опухоли или нарушения.

A1

202092671

202092671

A1

**ОПТИМИЗИРОВАННАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к новым сериям мультизамещенных фтором пиразолопиримидиновых соединений и к способам синтеза, а также к фармацевтическим композициям, содержащим соединения, описанные в настоящем документе, в качестве активных ингредиентов, и к способам ингибирования активности тирозинкиназы Брутона. Изобретение также относится к оптимизированным комбинациям различных лекарственных средств для ингибирования жизнеспособности клеток опухолей *in vitro* и опухолей *in vivo*. Оптимизированные комбинации оказывают синергический эффект, который может ингибировать выживаемость опухолей более эффективно, чем однонаправленные средства, и вызывать полное исчезновение некоторых опухолей. По сравнению с однонаправленными средствами, оптимизированные комбинации могут лучше исключать устойчивость к лекарственному средству и рецидив злокачественной опухоли. Оптимизированные комбинации являются более безопасными благодаря более низкой дозе, и можно укорачивать циклы лечения из-за лучших терапевтических эффектов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Противораковое лечение развивалось от токсичной химиотерапии до комбинированной химиотерапии (например, CHOP), антител (например, ритуксимаба), комбинации химиотерапии и терапии антителами (R-CHOP), и стимулирующей противораковой иммунитет терапии (антител против PD-1 и PD-L1), и терапии Т-клетками с химерным рецептором антигенов (CAR-T). Продолжительность и качество жизни пациентов улучшились, однако, из-за комплексной природы злокачественной опухоли, мутации в одном пути или путях передачи сигнала может приводить к неэффективному лечению или рецидиву заболевания. Направленная терапия малыми молекулами требует длительного ежедневного введения, и если введение лекарственного средства останавливают, может возникать эффект отмены или рецидив злокачественной опухоли. Способы доставки антител и химиотерапии являются

сложными. Комбинации антитела и химиотерапии могут оказывать аддитивные или синергические эффекты, но редко приводят к излечению злокачественной опухоли. Способы комбинированной терапии для направленной терапии с противораковой иммунотерапией или с иммунотерапией Т-клетками с химерным рецептором антигенов (CAR-T) разрабатываются, но могут иметь проблемы с безопасностью. Пероральная терапия обладает множеством преимуществ, например, можно немедленно прекращать введение, если возникают серьезные побочные эффекты. Для терапии антителами и клетками, сложно контролировать серьезные побочные эффекты. В настоящее время, однонаправленная терапия или комбинированная терапия с нацеливанием на два пути обладают некоторыми ограничениями, и таким образом, клиническая эффективность лечения злокачественных опухолей (общая частота ответа, ORR) в основном представляет собой частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) и редко - полный ответ (CR). Эти виды лечения, как правило, продлевают жизнь пациента только на несколько месяцев. Кроме того, комплексная клеточная терапия или комбинация антител с химиотерапией могут иметь проблемы с безопасностью. Более того, эти виды лечения ограничены больничными условиями. Эти указанные выше недостатки не только приводят к высокой стоимости лечения злокачественных опухолей, но также влияют на желание пациента проходить лечение, а также соблюдение режима лечения, и являются препятствием для распространения лечения злокачественных опухолей на большинство пациентов. Более того, стоимость нацеленной на один путь терапии составляет 100000-200000 \$ США на пациента, и стоимость способов комбинированной терапии может быть выше вдвое или даже выше. Разработка этих дорогостоящих видов лечения является нецелесообразной. Таким образом, как для пациентов, так и для рынка существует явная необходимость поиска лучшей комбинированной терапии. Ожидают, что новая комбинированная терапия будет более эффективной с меньшим количеством побочных эффектов и более коротким циклом лечения. С помощью подходящей сопутствующей диагностики, оптимизированная комбинированная терапия (персонализированная медицина или точная медицина) может

излечивать подтипы злокачественной опухоли или обеспечивать лучший контроль устойчивости к лекарственному средству.

Ибрутиниб, первый ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК), одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL) и хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), и для него показан хороший эффект, но в результате клинического лечения возникли C481s и другие мутации, вызывающие устойчивость к лекарственному средству (Furman et al: Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2014, 2352). Более того, фармакокинетика ибрутиниба сильно меняется среди пациентов (Marostica et al: Population pharmacokinetic [sic] model of Ibrutinib, a Bruton tyrosine kinase inhibitor, in patients with B cell malignancies, *Cancer Chemother Pharmacol* (2015) 75: 111-121), в токсикокинетическом исследовании обнаружено, что AUC у крыс и собак являются низкими, 1000 час*нг/мл (самцы крыс, 40 мг/кг) и 3300 час*нг/мл (самки крыс, 40 мг/кг), и 1780 час*нг/мл (самцы собак, 24 мг/кг), и 1850 час*нг/мл (самки собак, 24 мг/кг) (FDA's NDA Application Number 205552Orig1s000_pharmacological review). ВТК играет критическую роль в пути передачи сигнала В-клеток, связывающем стимуляцию В-клеточного рецептора (BCR) на клеточной поверхности с нижестоящими внутриклеточными ответами. ВТК является ключевым регулятором развития, активации, пролиферации и выживаемости В-клеток.

Эверолимус, ингибитор киназы-мишени рапамицина у млекопитающих, (mTOR), одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения рака молочной железы, рака поджелудочной железы, почечноклеточного рака, почечной ангиомиолипомы и туберозного склероза. Механизм действия белка mTOR полностью выяснен. mTOR является ключевым регулятором роста, пролиферации, метаболизма и апоптоза клеток в комплексных путях передачи сигнала. Кроме того, эверолимус используют для лечения отторжения трансплантата органа в низких дозах, поскольку трансплантация органов также активирует mTOR.

Помалидомид, иммуномодулирующее лекарственное средство (IMiD), одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в 2013 г. для лечения множественной миеломы (ММ). Помалидомид и его аналоги IMiD ингибируют факторы клеток TNF- α , IL- β , IL-6, IL-12 и GM-CSF. IMiD обладают антиангиогенными, антипролиферативными и проапоптотическими свойствами, и они также стимулируют Т-лимфоциты для индукции пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов Т-клетками и Т-клеточной цитотоксичности, таким образом, увеличивая противораковую активность Т-клеток.

Венетоклакс или АВТ-199, является новым и специфическим ингибитором В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) в клинических исследованиях. Белок Bcl-2 играет ключевую роль в апоптозе. АВТ-199 один раз запустил синдром лизиса опухоли (TLS) и привел к смерти пациента в клинических исследованиях.

Метотрексат (MTX) является антифолатным антинеопластическим лекарственным средством и лекарственным средством против ревматоидного артрита, в основном, посредством ингибирования дигидрофолатредуктазы для блокирования клеточного синтеза и ингибирования роста и пролиферации клеток.

ВТК является членом семейства протеинтирозинкиназ Tec. ВТК состоит из уникального N-концевого домена, т.е., области гомологии с плекстрином (PH), области гомологии с Tec (TH), гомологичного Src домена 3 (SH3), гомологичного Src домена 2 (SH2) и каталитического домена, и домена тирозинкиназы или гомологичного Src домена 1 (TK или SH1) из киназных доменов (Akinleye et al: Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development, Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:59). При нормальном развитии В-лимфоцитов, правильная экспрессия гена ВТК в различных областях играет ключевую роль в функционировании В-клеток и различных путях передачи сигналов.

ВТК функционирует ниже множества рецепторов, включая рецепторы факторов роста, В-клеточного антигена, хемокинов и врожденные иммунные рецепторы, и таким образом, инициирует разнообразный диапазон клеточных процессов, таких как

пролиферация, выживаемость, дифференцировка, подвижность клеток, ангиогенез, продукция цитокинов и представление антигенов. Таким образом, ВТК играет важную роль во многих путях передачи сигналов в гематопозитических клетках, и она также является критической для активации, развития, выживаемости и передачи сигнала В-клеток (Kurosaki, Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. Curr OP Imm, 1997, 9(3): 309-18).

Существуют свидетельства для доказательства того, что В-клетки оказывают иммунорегуляторные эффекты на их иммунные ответы и воспалительные ответы. Например, антитело против CD20 ритуксимаб (ритуксан) представляет собой лекарственное средство на основе поглощения белка В-клетками, и его используют для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как хронический лимфоцитарный лейкоз, и воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит. Таким образом, протеинкиназа, которая играет ключевую роль в активации В-клеток, может являться полезной при связанных с В-клетками заболеваниях.

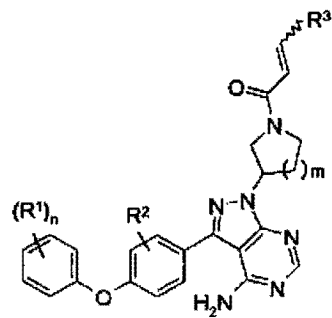
Доказательство роли ВТК в аутоиммунных заболеваниях представлено посредством моделей на мышах с недостаточностью ВТК и на мышах без недостаточности ВТК (Kil LP, et al: Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia. Am J Blood Res 2013, 3(1): 71-83.). В модели хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) на мышах, у мышах с недостаточностью ВТК полностью прекращался хронический лимфоцитарный лейкоз, сверхэкспрессия ВТК усиливала лейкоз, увеличивая смертность.

Избирательность известных ингибиторов ВТК не является идеальной: они ингибируют не только ВТК, но также различные другие киназы (такие как ЕТК, EGF, BLK, FGR, HCK, YES, BRK и JAK3, и т.д.), что может вызывать больше побочных эффектов. Ингибиторы с лучшей избирательностью могут вызывать меньше побочных эффектов.

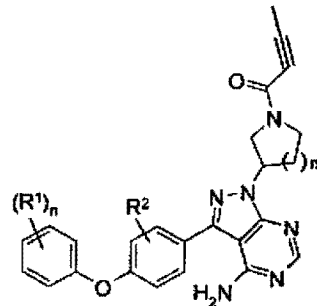
Известные ингибиторы ВТК образуют множество производных, которые также влияют на эффективность и побочные эффекты. Также известно, что фармакокинетику ингибиторов ВТК также можно улучшать.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

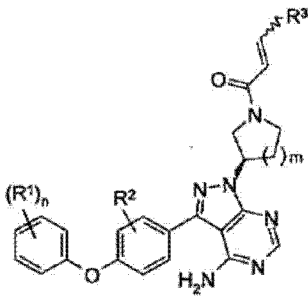
Изобретение относится к терапевтическим способам, включающим в себя ингибиторы ВТК, для лечения или подавления аутоиммунного заболевания, состояния гиперчувствительности, воспалительных заболеваний и злокачественных опухолей. Эффективные дозы для пациентов, описанных в настоящем документе, включают в себя соединения, обладающие структурой формулы (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), или их фармацевтически приемлемые соли.



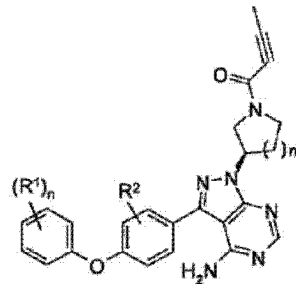
(I)



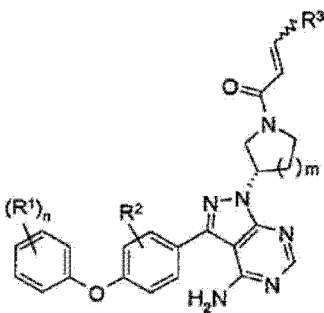
(II)



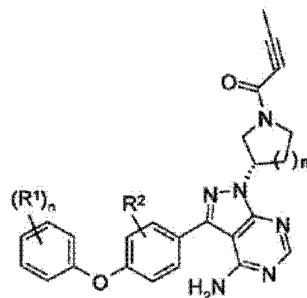
(Ia)



(IIa)



(Ib)



(IIb)

Где:

R¹ представляет собой фтор; n представляет собой 1, 2, 3 или 4;

R² представляет собой фтор; m представляет собой 1 или 2

R³ представляет собой водород или дейтерий

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, образованной с использованием кислоты или основания, включая, но без ограничения, (а) кислотно-аддитивные соли: неорганические кислоты (например, соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, азотная кислота и другие органические кислоты) и органические кислоты (например, уксусная кислота, щавелевая кислота, виннокаменная кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, дубильная кислота, памовая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота и салициловая кислота); (b) основно-аддитивные соли, образованные с использованием катионов металлов, таких как цинк, кальций, натрий, калий и т.д.

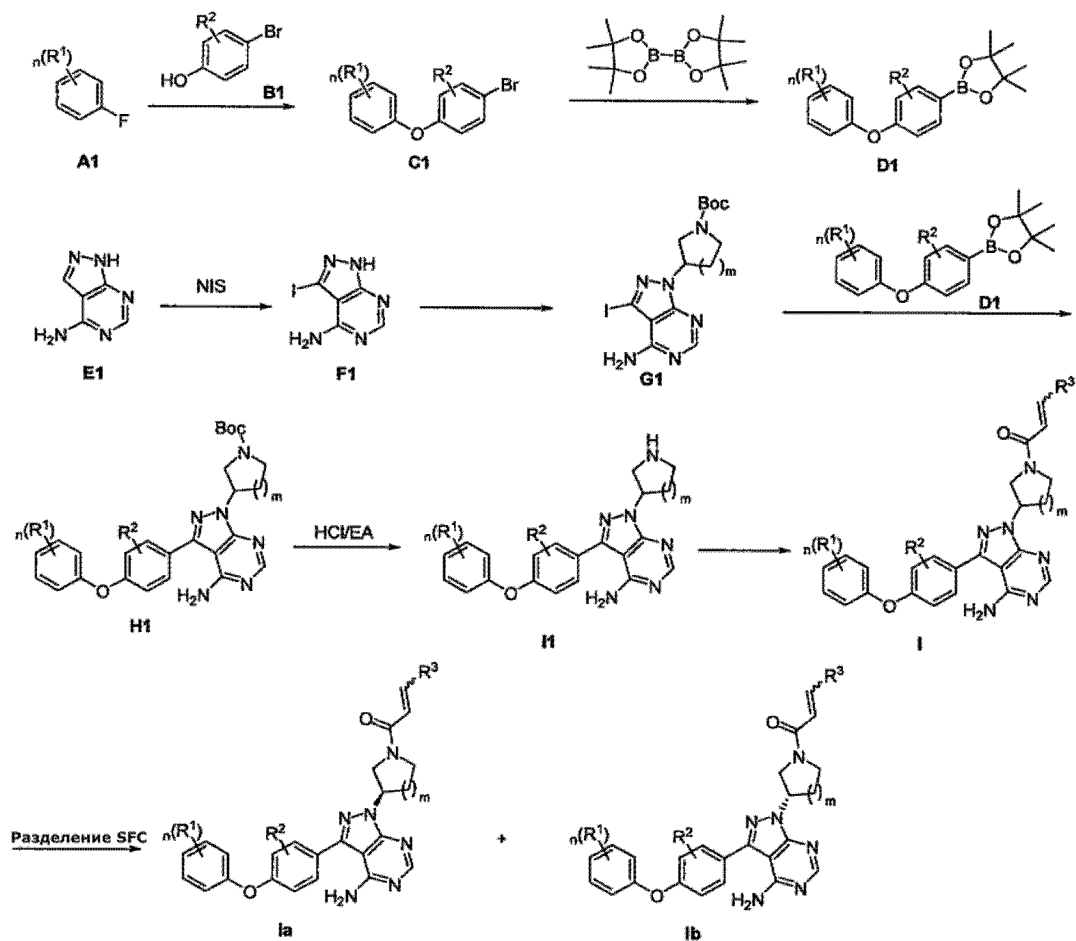
Схема синтеза

Настоящее изобретение проиллюстрировано примерами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения выбран из группы описанных вариантов осуществления и их фармацевтически приемлемых солей и их индивидуальных диастереомеров или их солей.

Создание способов синтеза активно исследовали. Новый способ синтеза пиразолопиримидиновых соединений успешно разработан (см. схемы 1-2 и конкретные примеры реакций).

Если не указано иначе, в следующих схемах реакций и обсуждении, R1, R2, R3, m, n имеют такое же значение, как определено выше.

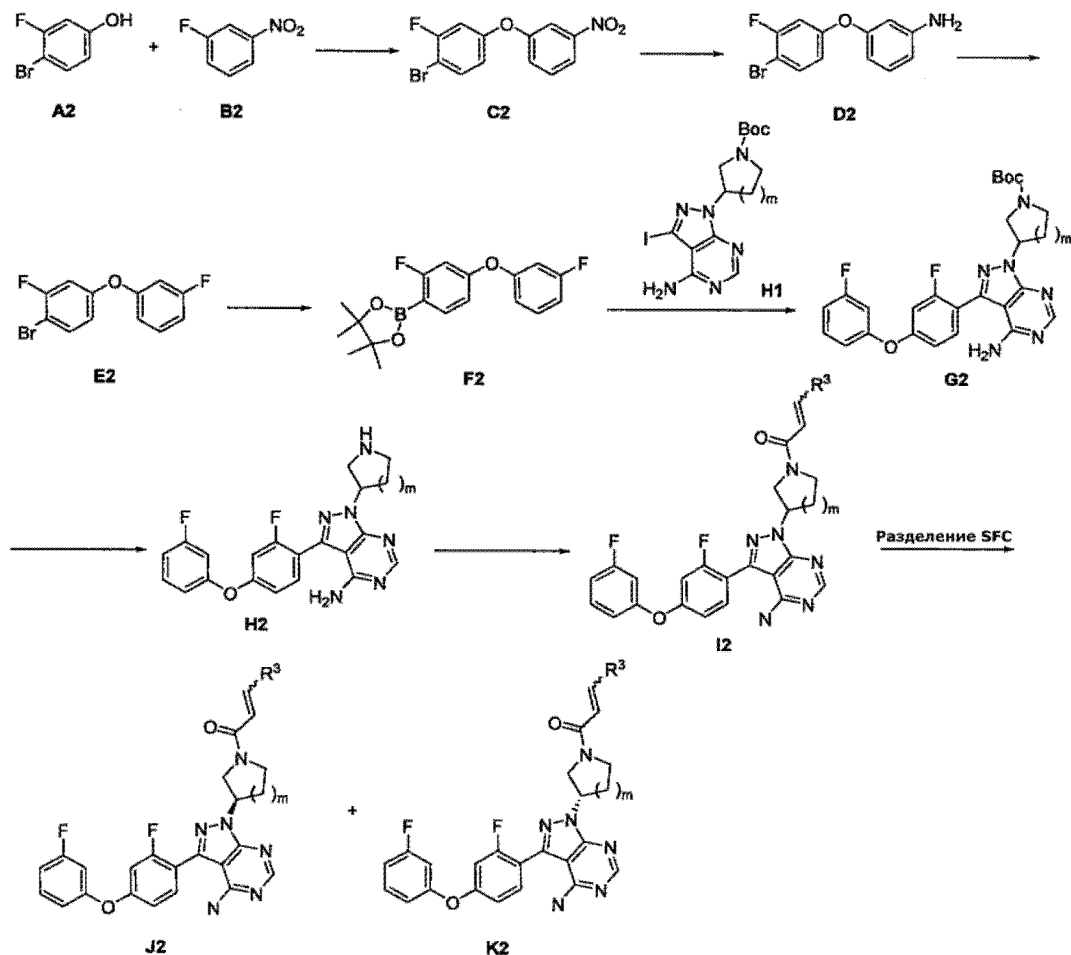
Схема 1



Замещенное фтором исходное вещество A1 обрабатывали замещенным фенолом B1 для получения промежуточного соединения C1 в основных условиях (например, с карбонатом калия) в подходящем растворителе (например, DMF). Затем проводили реакцию промежуточного соединения C1 с бис(пинаколато)дибором для получения промежуточного соединения D1 с подходящим катализатором (например, [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладием(II)) в основных условиях (например, в ацетате калия) в подходящем растворителе (например, 1,4-диоксане). Иодированием 1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина с использованием NIS получали промежуточное соединение F1, с последующей реакцией Мицунобу или реакцией вытеснения для образования промежуточного соединения G1. Промежуточное соединение G1 обрабатывали полученным выше соединением D1 для получения промежуточного соединения H1 с подходящим катализатором (например, Pd-118) в основных условиях (например, в фосфате калия) в подходящем растворителе (например, 1,4-диоксане). При снятии защиты Boc с промежуточного соединения

Н1 получали амин I1 в кислых условиях. Проводили реакцию промежуточного соединения I1 с электрофильным реагентом для получения амида J1. Если J1 является рацемическим, оптически активные соединения K1 и L1 можно получать посредством хирального разделения SFC.

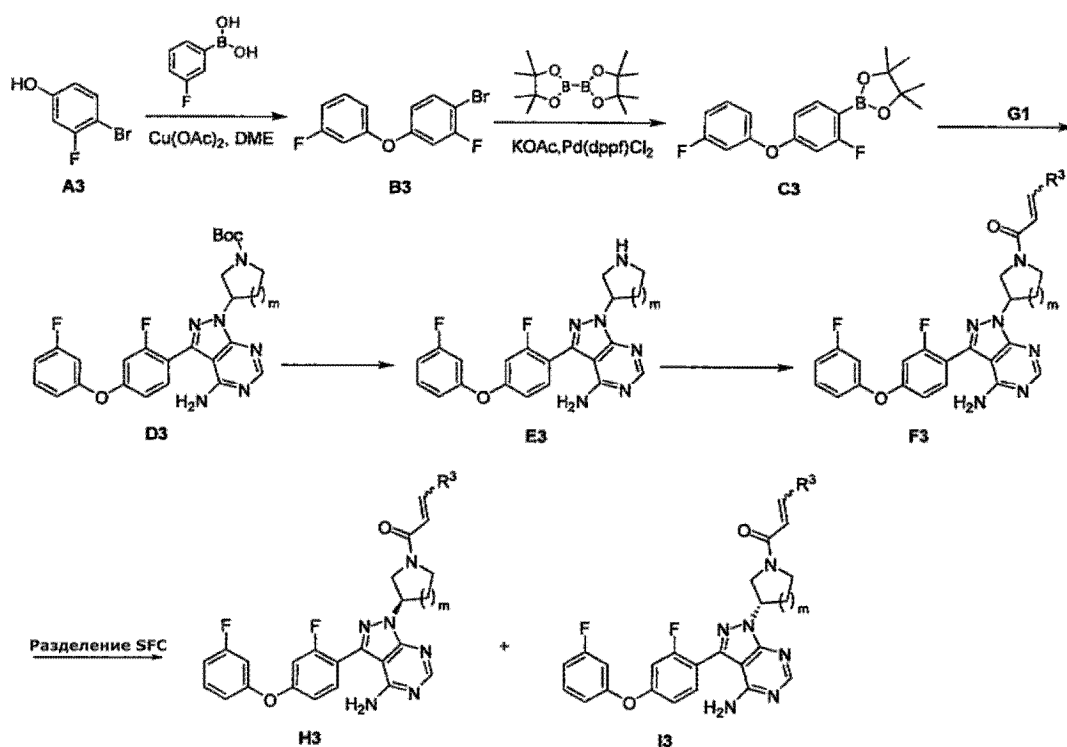
Схема 2



Проводили реакцию 3-фтор-4-бромфенола с 1-фтор-3-нитробензолом для получения промежуточного соединения C2 с основанием (например, карбонатом калия) в подходящем растворителе (например, DMF). Полученное нитросоединение C2 восстанавливали до амина D2 с использованием подходящих восстанавливающих реагентов (например, порошка железа и хлорида аммония) в подходящих растворителях (например, в этаноле и воде), с последующей обработкой нитритом натрия и гидрофторидом пиридина для получения замещенного фтором промежуточного соединения E2. Затем проводили реакцию промежуточного соединения E2 с бис(пинаколато)дибором для получения промежуточного

соединения F2 с подходящим катализатором (например, [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладием(II)) в основных условиях (например, в ацетате калия) в подходящем растворителе (например, в 1,4-диоксане). Промежуточное соединение H1 обрабатывали полученным выше соединением F2 для получения промежуточного соединения G2 с подходящим катализатором (например, Pd-118) в основных условиях (например, в фосфате калия) в подходящем растворителе (например, в 1,4-диоксане). При снятии защиты Boc с промежуточного соединения G2 получали амин H2 в кислых условиях. Проводили реакцию промежуточного соединения H2 с электрофильным реагентом для получения амида I2. Если I2 является рацемическим, оптически активные соединения J2 и K2 можно получать посредством хирального разделения SFC.

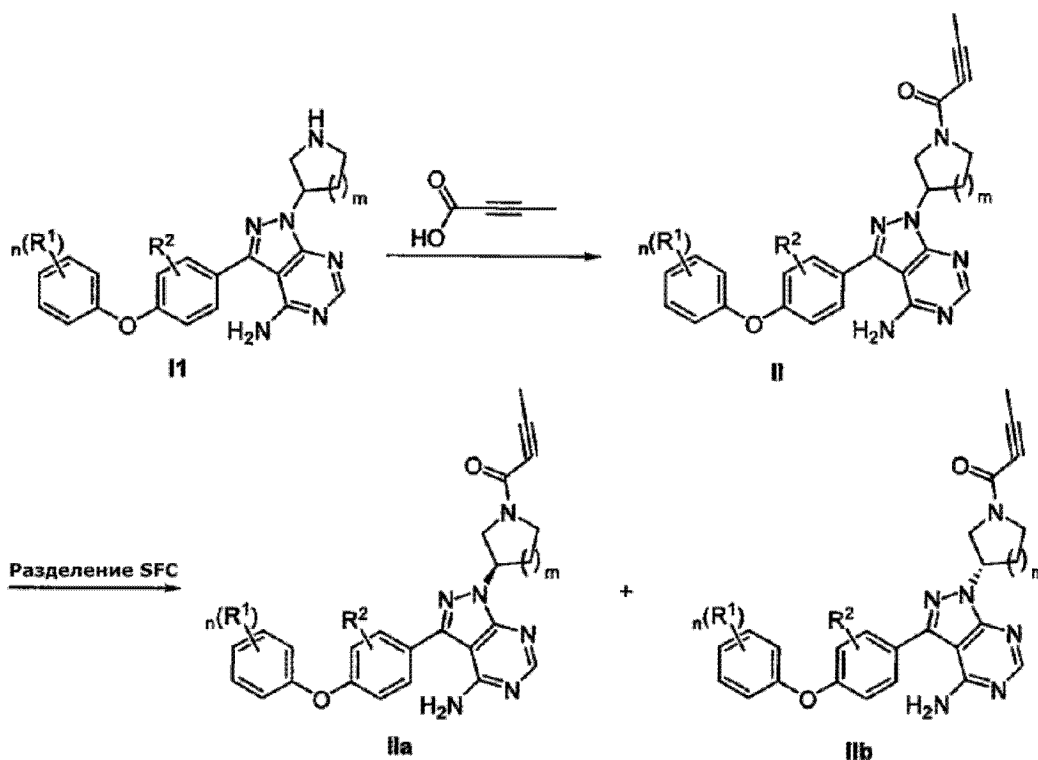
Схема 3



Проводили реакцию 3-фтор-4-бромфенола с 3-фторфенилбороновой кислотой для получения промежуточного соединения B3 с подходящим катализатором (например, медь ацетат). Затем проводили реакцию промежуточного соединения B3 с бис(пинаколато)дибором для получения промежуточного соединения C3 с подходящим катализатором (например, с [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладием(II)). Промежуточное

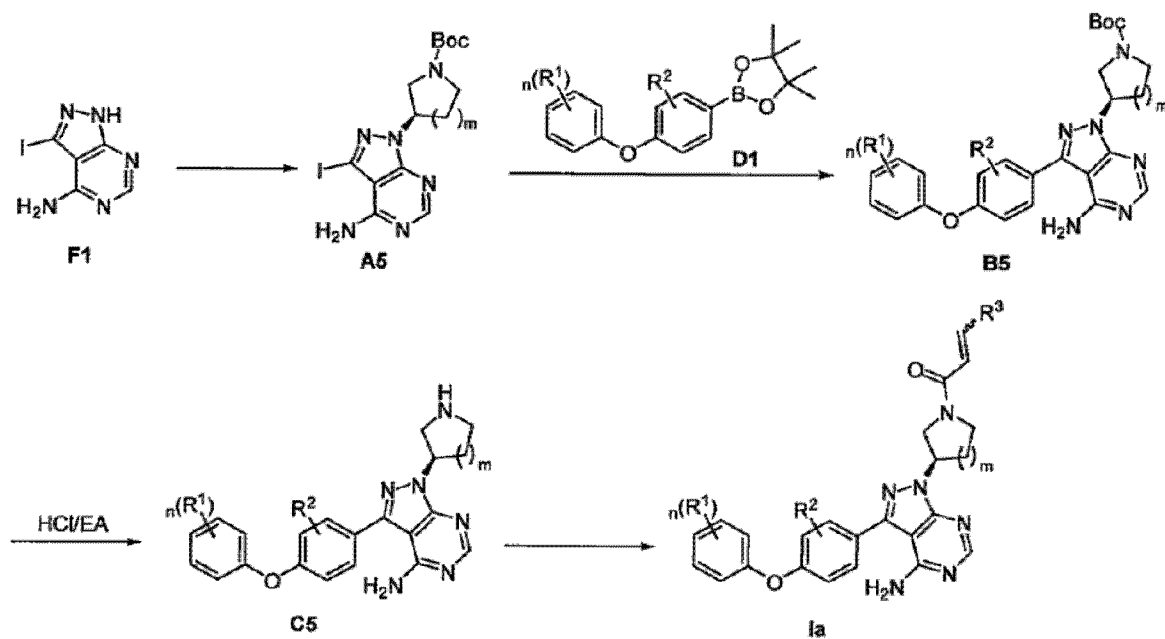
соединение G1 обрабатывали полученным выше соединением С3 для получения промежуточного соединения D3 с подходящим катализатором (например, с [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладием(II)) в основных условиях (например, в ацетате калия) в подходящем растворителе (например, 1,4-диоксане). При снятии защиты Вос с промежуточного соединения D3 получали амин E3 в кислых условиях. Проводили реакцию промежуточного соединения E3 с электрофильным реагентом для получения амида F3. Если F3 является рацемическим, оптически активные соединения H3 и I3 можно получать посредством хирального разделения SFC.

Схема 4



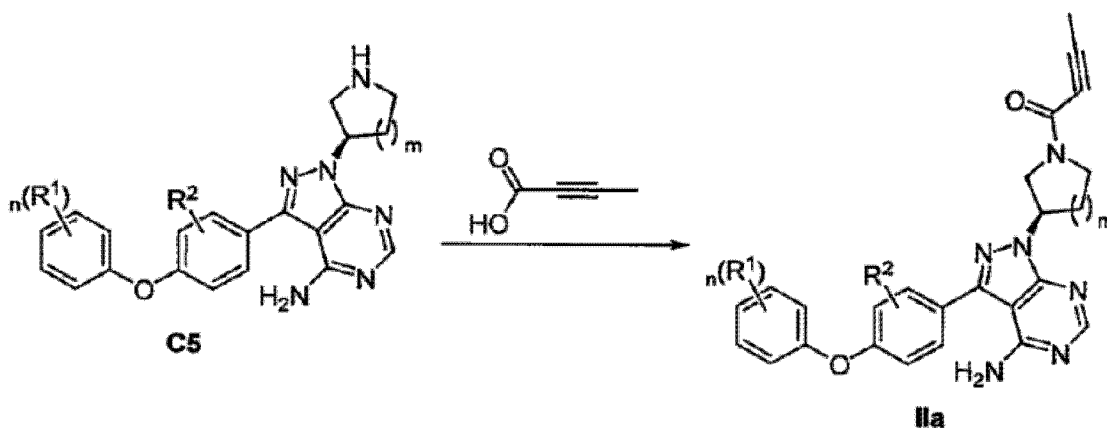
Можно проводить реакцию аминного соединения I1 с 2-бутиновой кислотой для получения соединения II. Если соединение II является рацемическим, оптически активные соединения IIa и IIb можно получать посредством хирального разделения SFC.

Схема 5



Оптически активное промежуточное соединение А5 получали из промежуточного соединения F1 посредством реакции Мицунобу или реакции замещения. В присутствии подходящего основания, например, фосфата калия, и подходящего катализатора (например, Pd-118), можно проводить реакцию промежуточного соединения А5 с боронатным сложным эфиром D1 в подходящем растворителе, например, в 1,4-диоксане и воде, для получения промежуточного соединения В5. При снятии защиты Boc с промежуточного соединения В5 в кислых условиях получали аминное соединение С5. Можно проводить реакцию аминного соединения А5 с электрофильным реагентом для получения соединения Ia.

Схема 6



Можно проводить реакцию аминного соединения С5 с 2-бутиновой кислотой для получения соединения IIa.

Настоящее изобретение относится к соединениям, обладающим структурой, показанной в формуле (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), и к их энантиомерам, к их диастереомерам или к их фармацевтически приемлемым солям.

Соединения формулы (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb) по настоящему изобретению содержат один или несколько стабильных изотопов или радиоактивных изотопов, где изотопы включают в себя, но без ограничения, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O и т.д.

Настоящее изобретение является первым случаем введения ^2H , который является изотопом ^1H , в ингибиторы ВТК.

^1H , находящийся на конце двойной связи винильной группы в соединениях формулы (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), можно заменять на ^2H для уменьшения инактивации лекарственного средства, вызванной окислением/восстановлением двойной связи.

Настоящее изобретение относится к способам получения соединений, представленных формулами (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), их энантиомеров и их диастереомеров.

Изобретение относится к способам регуляции активности ВТК и лечения или подавления заболеваний, ассоциированных с активностью ВТК. Подтверждено, что соединения в настоящем документе ингибируют активность ВТК. Настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), в качестве фармацевтически активных ингредиентов для лечения и/или предотвращения следующих заболеваний, где эти заболевания вызваны неблагоприятной передачей сигналов посредством цитокинов, включая, но без ограничения:

(1) аутоиммунные заболевания, такие как хронический лимфоцитарный тиреоидит, гипертиреоз, инсулин-зависимый сахарный диабет, миастения, хронический язвенный колит, пернициозная анемия, ассоциированная с хроническим атрофическим гастритом, синдром Гудпасчера, обыкновенная пузырчатка, пемфигоид, первичный билиарный цирроз, рассеянный склероз, острый идиопатический неврит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, псориаз, системный васкулит, склеродермия, пемфигус, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунная

гемолитическая анемия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, язвенный колит и т.д.;

(2) иммунные нарушения, такие как сывороточная реакция, астма, аллергический ринит, аллергия на лекарственное средство и т.д.;

(3) воспалительные заболевания, такие как кератит, ринит, стоматит, эпидемический паротит, фарингит, тонзиллит, трахеит, бронхит, пневмония, миокардит, гастрит, гастроэнтерит, холецистит, аппендицит и т.д.;

(4) злокачественные опухоли, включая, но без ограничения, различные В-клеточные злокачественные новообразования (включая мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL) и другие заболевания, при которых можно получить преимущество от ингибирования активности ВТК.

Другие заболевания при которых можно получить преимущество от ингибирования активности ВТК, включают в себя, но без ограничения, : опухоли мозга, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак эндометрия, колоректальный рак, рак почки, рак пищевода, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, злокачественные опухоли костной ткани, рак кожи, рак толстого кишечника, опухоли женского репродуктивного тракта, лимфомы, множественную миелому (ММ), рак яичка и т.д.

Способ в настоящем документе включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из пп. 1-2.

В соответствии со стандартной фармацевтической практикой, соединения (ингибиторы ВТК) по изобретению можно использовать отдельно в фармацевтическом составе или с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами в фармацевтической комбинации, где фармацевтический состав, содержащий ингибиторы ВТК, и дополнительные лекарственные средства могут иметь одинаковый или различные способы введения, и одинаковое или

различное время введения. Дополнительные лекарственные средства в настоящем документе включают в себя (но без ограничения):

ингибиторы тирозинкиназы (например, акситиниб, дазатиниб, икотиниб);

ингибиторы топоизомеразы (например, топотекан);

ингибиторы протеинкиназы С (например, АЕВ-071);

агонисты рецептора сфингозин-1-фосфата (например, финголимод, KRP-203);

иммуноглобулин против Т-клеток (например, AtGam);

антитело против рецептора IL-2 (например, даклизумаб);

амиды (CTX), ифосфамид (IFO), адриамицин (ADM), даунорубицин (DNR), винкристин (VCR), винбластин (VBL), этопозид (VP16), вермеер (вумон), карбоплатин (CBP) и метотрексат (MTX), циклоспорин А, такролимус, сиролимус, эверолимус, азатиоприн, бреквинар, лефлуномид, LEA-29Y, антитело против CD3 (например, ОКТ3), аспирин;

блокирующие B7-CD28 молекулы (например, белатацепт, абатацепт);

блокирующие CD40-CD154 молекулы (антитела против CD40);

ацетаминофен, ибупрофен, напроксен, пироксикам и противовоспалительные стероиды (например, преднизолон или дексаметазон);

ингибиторы тирозинкиназы Брутона (BTK) включая все известные, но без ограничения: ибрутиниб, соединение **3**, соединение **5**, ACP-196 (Acerta Pharma), BGB-3111 (BeiGene), AVL-292 (Celgene), ONO-4059 (One Pharmaceutical), HM71224 (Hanmi Pharmaceutical), RN486 (Roche), CNX-774, CGI-11746 и т.д.

Ингибиторы mTOR включают в себя все известные, но без ограничения, : эверолимус, рапамицин, XL388, GDC-0349, AZD2014, AZD8055, GSK105965, MLN0128, ридафорлимус и т.д.

Иммуномодулирующие лекарственные средства (IMiD) включают в себя все известные, но без ограничения, : талидомид, ревлимид, помалидомид, CC-122 и CC-220.

Ингибиторы киназы PI3K включают в себя все известные, но без ограничения: BTG226, PF-05212384 (гедатолисиб), GDC-0980

(апитолисиб), GSK2126458, BEZ235, IPI-145 (дувелисиб), CAL-101 (иделалисиб) и т.д.

Ингибиторы Всл-2 включают в себя все известные, но без ограничения, : АВТ-199 (венетоклакс), ВІ-97С1 (сабутоклакс) и т.д.

Ингибиторы ТОРК включают в себя все известные, но без ограничения: OTS964 (Oncotherapy Science).

Ингибиторы киназы JAK3 включают в себя все известные, но без ограничения: тофацитиниб.

Ингибиторы киназы JAK1/2 включают в себя все известные, но без ограничения: руксолитиниб.

Ингибиторы киназы ALK включают в себя все известные, но без ограничения: кризотиниб, церитиниб и СН5424802 (алектиниб).

Настоящее изобретение также относится к оптимизации и скринингу различных специфических фармацевтических композиций *in vitro* и *in vivo* в моделях опухолей на животных. Соединение или фармацевтическая композиция, которые могут уничтожать клетки опухолей, не обязательно являются эффективными в моделях опухолей на животных, из-за фармакокинетических проблем лекарственного средства. Таким образом, без данных подавления опухоли у животных, только данные подавления *in vitro* не могут показать пригодность соединения или фармацевтической композиции в качестве лекарственного средства. По настоящему изобретению принимают пероральное введение через зонд (вместо внутрибрюшинной инъекции или внутривенной инъекции), чтобы избежать неопределенностей фармакокинетики, оптимизировать и скринировать различные соединения и фармацевтические композиции во множестве моделей опухолей на животных для осуществления оценки пригодности в качестве лекарственного средства.

По существующему уровню техники отмечают, что ингибитор ALK и ингибиторы ВТК оказывают синергический эффект подавления клеток опухолей *in vitro*, в то время как по настоящему изобретению показан противоположный результат: ингибитор ALK (церитиниб) и ингибитор ВТК ибрутиниб не оказывают синергического эффекта.

По существующему уровню техники отмечают также, что ингибитор JAK2 и ингибиторы ВТК оказывают синергический эффект подавления клеток опухолей *in vitro*, в то время как по настоящему изобретению показан противоположный результат: ингибитор JAK1/2 (руксолитиниб) и ингибиторы ВТК или ингибиторы mTOR, или иммуномодулирующие лекарственные средства не только не оказывают синергического эффекта, но также не вызывают никакого подавления клеток опухолей TMD-8.

По настоящему изобретению описаны фармацевтические комбинации «два в одном» и «три в одном» (фармацевтические композиции или фармацевтические комбинации), превосходящие однонаправленные лекарственные средства. Фармацевтические комбинации «два в одном» и «три в одном» оказывают синергические эффекты в более низких дозах. Составы фармацевтической комбинации по настоящему изобретению не являются ограниченными конкретным соотношением, описанным в настоящем документе для анализа *in vitro* и *in vivo*.

Изобретение также относится к оптимизации фармацевтической комбинации на основании множества ключевых путей передачи сигналов, контролирующих рост, пролиферацию, выживаемость и апоптоз клеток. Однонаправленная терапия часто приводит к устойчивости к лекарственному средству, вызванной мутациями генов, что приводит к уменьшенной эффективности лекарственного средства и приводит к рецидиву заболевания. Фармацевтические комбинации могут преодолевать устойчивость к лекарственному средству и достигать лучшего терапевтического эффекта или излечения заболевания. По настоящему изобретению показано, что фармацевтические комбинации оказывают синергический эффект на клетки опухолей и способность к синтетической летальности клеток опухолей. Активность фармацевтических комбинаций в 100 раз превышает активность однонаправленных лекарственных средств. По сравнению с однонаправленными лекарственными средствами, для фармацевтических комбинаций показан также заметный эффект в различных моделях ксенотрансплантатов посредством перорального введения через зонд, в намного меньших дозах (например: 1/18 соединения **3** (ингибитора ВТК)+1/6 эверолимуса (ингибитора

mTOR)+1/6 помалидомида (IMiD)), и они оказывают намного лучшие терапевтические эффекты, чем однонаправленные лекарственные средства. Фармацевтические комбинации «два в одном» приводят к полной регрессии опухолей в 15-суточном цикле лечения, в то время как фармацевтические комбинации «три в одном» приводят к полной регрессии опухолей в более коротком цикле лечения (9 суток). Более того, опухоль не возникала в результате отмены в течение 12 суток после остановки введения, что значительно лучше, чем при однонаправленной терапии. Однонаправленная терапия не только требует длительного лечения, но часто сопровождается возникновением опухоли в результате отмены, устойчивостью к лекарственному средству и рецидивом злокачественной опухоли. Оптимизированные фармацевтические комбинации обладают лучшей безопасностью и более широким терапевтическим окном, чем однонаправленные лекарственные средства, поскольку дозы комбинаций являются намного более низкими, чем доза каждого лекарственного средства, и в то же время, для комбинаций показан более заметный эффект. Уникальные свойства вышеуказанных фармацевтических комбинаций по настоящему изобретению могут давать новую надежду пациентам с невосприимчивой злокачественной опухолью.

По настоящему изобретению, фармацевтические комбинации «три в одном», где концентрация ингибитора ВТК была настолько низкой, как 10 нМ, подавляли жизнеспособность настолько многих клеток опухолей, как 95%. Это являлось неожиданным и не могло быть выведено или получено, руководствуясь существующими изобретениями. Подавление жизнеспособности клеток тестировали после инкубации в течение 48 часов. Если время инкубации увеличивать до 72-96 час, для фармацевтических композиций могут показывать намного более сильное подавление жизнеспособности клеток. По настоящему изобретению показано, что подавление жизнеспособности клеток *in vitro* коррелировало с подавлением опухоли *in vivo*. По подавлению жизнеспособности клеток *in vitro* можно прогнозировать подавление опухоли *in vivo*. Эффективное подавление жизнеспособности клеток *in vitro* может приводить к регрессии или полному исчезновению опухоли при наиболее низкой

концентрации (например, 10 нМ). Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут подавлять и уничтожать клетки опухолей эффективно при концентрациях, настолько низких, как 10 нМ, что обеспечивает для изобретения очень важные клинические применения. При лечении пациентов, концентрации лекарственных средств из комбинации в клетках опухолей могут легко достигать 10-100 нМ, и таким образом, приводить к лучшему терапевтическому эффекту. В настоящее время, однонаправленная терапия или комбинированная терапия для двух путей является эффективной для подавления роста клеток опухолей при концентрации соединения 1000 нМ. Например, АВТ-199 подавлял жизнеспособность клеток TMD-8 при 1000 нМ, 100 нМ и 10 нМ на 37,6%, 18,8% и 11,1%, соответственно. Композиции «два в одном» АВТ-199 и ингибитора ВТК (соединения **3**) подавляли жизнеспособность клеток TMD-8 на 85,97%, 79,99% и 65,36%, соответственно. Композиции «три в одном» АВТ-199, ингибитора ВТК (соединения **3**) и ингибитора PI3K подавляли жизнеспособность клеток TMD-8 на 95,56%, 95,30%, и 94,62%, соответственно. Фармацевтическая композиция «три в одном», содержащая АВТ-199, соединение **3** (ингибитор ВТК) и ингибитор mTOR эверолимус, также эффективно подавляла жизнеспособность клеток TMD-8 на 93,44%, 94,73% и 94,65%, соответственно. Превосходный синергический эффект по настоящему изобретению не является выведенным или полученным, руководствуясь существующим уровнем техники.

Настоящее изобретение относится к следующему (1) комбинация «три в одном» ингибиторов тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторов киназы mTOR и иммуномодулирующих лекарственных средств (IMiD) является одной из наилучших комбинаций; двумя другими наилучшими комбинациями «три в одном» являются: (2) ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы киназы mTOR и ингибиторы Vcl-2; (3) ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы PI3K и ингибиторы Vcl-2. Вторыми из наилучших фармацевтических комбинаций являются фармацевтическая комбинация «два в одном», содержащая ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК) и ингибитор киназы mTOR, фармацевтическая комбинация «два в одном», содержащая ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК) и

помалидомид (IMiD), фармацевтическая комбинация «два в одном», содержащая ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК) и ингибиторы ТОРК, фармацевтическая комбинация «два в одном», содержащая ингибиторы ТОРК и ингибиторы PI3K, и фармацевтическая комбинация «два в одном», содержащая ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК) и ингибиторы PI3K.

По настоящему изобретению показано, что некоторые комбинации оказывают синергический эффект подавления, а некоторые не оказывают синергического эффекта и могут приводить к обратным результатам. Пути передачи сигналов являются избыточными, пересекающимися и сложными. Комбинации, которые могут одновременно подавлять пути передачи множества сигналов, являются намного более сложными. Таким образом, превосходные синергические эффекты наилучших комбинаций «три в одном» по этому изобретению не являются выведенным или полученными, руководствуясь существующим уровнем техники.

Настоящее изобретение относится к способу оптимизации подавления жизнеспособности клеток *in vitro*, подавления опухолей *in vivo* и к ряду моделей опухолей, и решает проблему оценки пригодности фармацевтических комбинаций в качестве лекарственного средства.

По настоящему изобретению показано, что в моделях опухолей на животных при пероральном введении через зонд, только фармацевтические композиции «три в одном» (ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибитор киназы mTOR и иммуномодулирующие лекарственные средства (IMiD)) и «два в одном» (ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК) и ингибиторы киназы mTOR) могут приводить к полному исчезновению опухолей, и после прекращения введения, возникновения опухоли в результате отмены не наблюдали. Другие комбинации только подавляют рост опухоли, и их необходимо вводить постоянно для подавления роста опухоли. Монотерапия эверолимусом может приводить к полному исчезновению опухолей в высоких дозах, но опухоли быстро возникали в результате отмены после введения, что является дефектом однонаправленной терапии. Настоящее изобретение

избавляет от этого дефекта, и ожидают излечения злокачественной опухоли в отдельных случаях.

Изобретение не только подтверждает превосходный эффект подавления для фармацевтических комбинаций в модели чувствительной опухоли TMD-8, но также доказывает хороший эффект подавления в моделях нечувствительной опухоли DoHH2 и в моделях устойчивой и невосприимчивой опухоли WSU-DLCL, соответственно. Эффективность фармацевтических комбинаций «три в одном» все еще является наилучшей, хотя опухоли не исчезали полностью в двух последних моделях. Например, для соединения EZ-6438 (ингибитора метилтрансферазы гистонов EZH2) можно достигать сходного эффекта в модели опухоли WSU-DLCL посредством введения мышам через зонд в очень высоких дозах (480 мг/кг/сутки) в соответствии с сообщением Eprizume, в то время как доза комбинации «три в одном» по изобретению составляет только 21 мг/кг/сутки.

По настоящему изобретению впервые показано, что многонаправленная комбинированная терапия оказывает лучший эффект и сильно уменьшает дозу отдельного лекарственного средства. Таким образом, можно дополнительно уменьшать побочные эффекты каждого лекарственного средства и делать комбинированное лечение намного более безопасным и более эффективным.

Многонаправленную комбинированную терапию по настоящему изобретению можно использовать для лечения злокачественной лимфомы и лейкоза, образованных В-клетками, а также злокачественных опухолей и солидных опухолей, образованных Т-клетками.

Многонаправленную комбинацию по настоящему изобретению также можно использовать для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы mTOR и иммуномодулирующие лекарственные средства (IMiD) в качестве активных ингредиентов.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК),

ингибиторы mTOR и ингибиторы Vcl-2 в качестве активных ингредиентов.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы PI3K и ингибиторы Vcl-2 в качестве активных ингредиентов.

Настоящее изобретение также относится к применению соединений формул (I), (II), (Ia), (Ib) и (IIb) для получения лекарственных средств, которые регулируют активность ВТК, а также лечат или подавляют заболевание, ассоциированное с активностью ВТК.

Настоящее изобретение также относится к применению соединений формул (I), (II), (Ia), (Ib) и (IIb), ингибиторов киназы mTOR и/или иммуномодулирующих лекарственных средств (IMiD) для получения лекарственных средств, которые регулируют активность ВТК, а также лечат или подавляют заболевание, ассоциированное с активностью ВТК.

Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих два или три соединения, выбранные из ингибиторов тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторов киназы mTOR и иммуномодулирующих лекарственных средств (IMiD), для получения лекарственных средств, которые регулируют активность ВТК, лечат или подавляют заболевание, ассоциированное с активностью ВТК.

Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы киназы mTOR, и ингибиторы Vcl-2, для получения лекарственных средств, которые регулируют активность ВТК, лечат или подавляют заболевание, ассоциированное с активностью ВТК.

Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы киназы PI3K и ингибиторы Vcl-2, для получения лекарственных средств, которые регулируют активность ВТК, лечат или подавляют заболевание, ассоциированное с активностью ВТК.

Носители, наполнители и другие добавки, общепринятые для фармацевтических препаратов, можно использовать для получения фармацевтических композиций, содержащих одно или два, или более

соединений формул (I), (II), (Ia), (Ib) и (IIb) или их фармацевтически приемлемых солей в качестве активных ингредиентов.

Формы для введения могут представлять собой пероральные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли, капсулы, гранулы, порошки, эмульсии, сиропы, суспензии, жидкие препараты или не относящиеся к пероральным лекарственные формы, такие как средство для внутривенной инъекции или внутримышечной инъекции, суппозиторий, подкожное средство, чрескожное средство, назальное средство, средство для ингаляции. Симптомы, возраст, пол и т.д. индивидуального пациента следует учитывать для правильного определения дозы соединения. Говоря в общем, в случае перорального введения, ежесуточные дозы соединения для взрослых пациентов составляют от приблизительно 0,001 мг/кг до 100 мг/кг, в однократной дозе или с разделением на 2-4 раза в сутки. В случае внутривенного введения в соответствии с симптомами пациента, говоря в общем, ежесуточные дозы для взрослых пациентов составляют от 0,0001 мг/кг до 10 мг/кг, один или несколько раз в сутки. Кроме того, в случае введения с использованием ингалятора, говоря в общем, ежесуточные дозы для взрослых пациентов составляют от 0,0001 мг/кг до 1 мг/кг, один или несколько раз в сутки.

По настоящему изобретению, твердые композиции для перорального введения могут представлять собой таблетки, порошки, гранулы и т.п. В таких твердых композициях смешивают одно или несколько действующих веществ по меньшей мере с одним инертным наполнителем (например, лактозой, маннитом, глюкозой, гидроксипропилцеллюлозой, микрокристаллической целлюлозой, крахмалом, поливинилпирролидоном, алюмосиликатом магния и т.д.). В соответствии с общепринятым способом, композиция может содержать инертные добавки, такие как смазывающие средства (например, стеарат магния), дезинтегрирующие средства (например, карбоксиметилкрахмал натрия) и способствующие растворению средства. При необходимости, таблетки или пилюли можно покрывать сахарным покрытием или растворяющимся в кишечнике или желудке покрывающим средством.

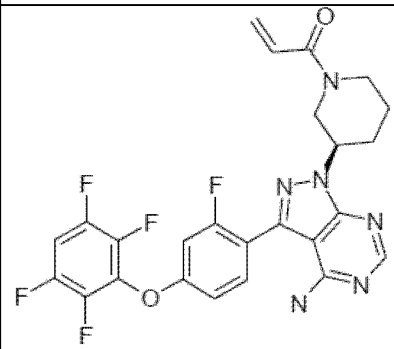
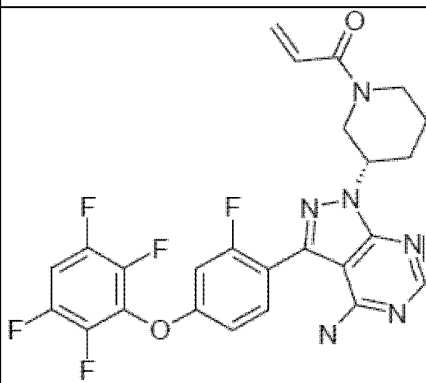
Жидкие композиции для перорального введения включают в себя фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы, эликсиры и общепринятые инертные разбавители (например, очищенную воду, этанол). В дополнение к инертному разбавителю, композиция может также содержать добавки, такие как солюбилизаторы, увлажняющие средства, суспендирующие средства и подсластители, ароматизаторы и консерванты.

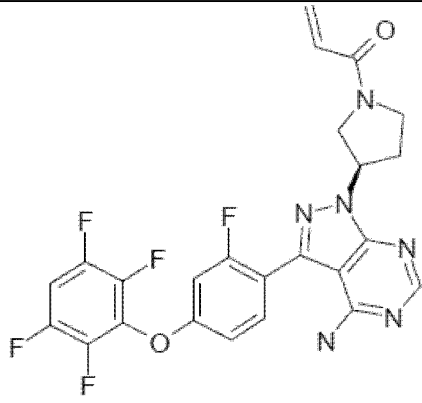
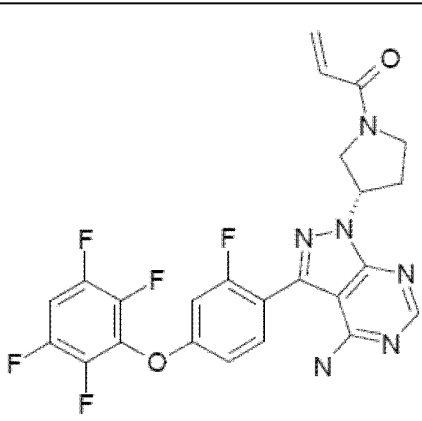
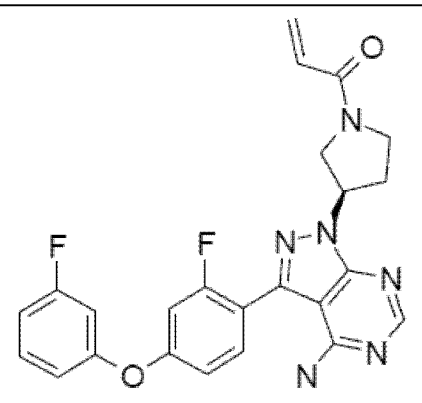
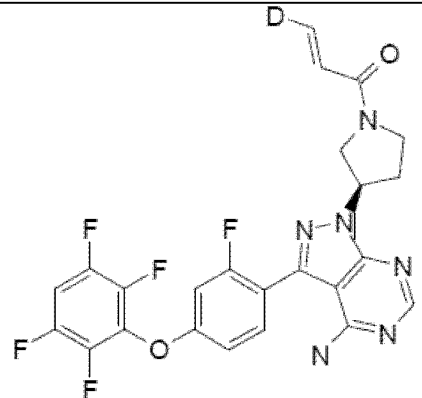
Инъекции для парентерального введения включают в себя стерильные водные или неводные жидкие препараты, суспензии и эмульсии. Водный раствор разбавителя, который можно использовать (например), включает в себя дистиллированную воду для инъекций и физиологический солевой раствор. Неводный раствор разбавителя, который можно использовать (например), включает в себя пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла (такие как оливковое масло), спирты (например, этанол) и полисорбат 80. Такие композиции могут дополнительно содержать средства для придания изотоничности, такие как консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы, диспергирующие средства, стабилизаторы, способствующие растворению средства и подобные добавки. Можно применять фильтрацию через задерживающий бактерии фильтр, добавление бактерицидов или облучение светом в качестве способа стерилизации композиции. Кроме того, эти композиции можно получать в форме стерильных твердых композиций перед использованием, и затем стерильную воду или стерильный растворитель добавлять для инъекции перед использованием в форме растворенной или суспендированной жидкости.

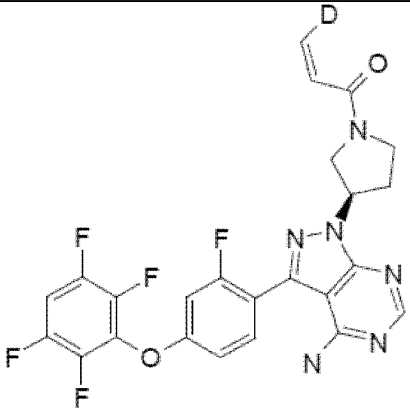
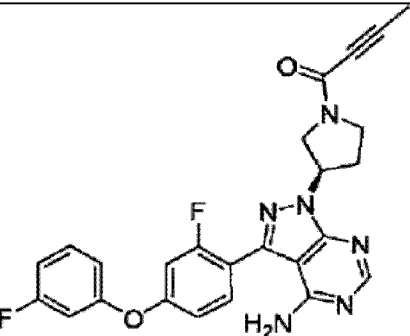
Трансмукозальные средства, такие как средства для ингаляции и назальные средства, и т.п., могут находиться в твердом, жидком или полужидком состоянии для применения, и могут находиться в соответствии с общеизвестными способами, используемыми для получения этих трансмукозальных средств. Например, по мере необходимости можно добавлять наполнитель (например, лактозу и крахмал), средство для регуляции pH, консервант IJ, поверхностно-активные вещества, смазывающие средства IJ, стабилизаторы и загустители, и т.п. Подходящее устройство для ингаляции или инсуффляции можно использовать для введения.

Например, можно использовать дозирующие устройства для ингаляции вместе с известным устройством или распылителем, где соединение можно использовать отдельно или в форме смеси после введения порошкообразного состава. Кроме того, после того, как соединение можно комбинировать с фармацевтически приемлемым носителем, его можно вводить в форме раствора или суспензии. Ингалятор для сухого порошка или т.п. можно использовать для однократной дозы или для множественных доз, и можно использовать сухой порошок или содержащую порошок капсулу. Кроме того, можно использовать также форму аэрозольного спрея под давлением для введения с использованием подходящего пропеллента (например, хлорфторалкана, гидрофторалкана или подходящего газа, такого как диоксид углерода).

Таблица 1. Репрезентативные соединения для ингибиторов ВТК

Соединение	Структура	Наименование	M+1
1		1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-трифторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он	531
2		1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-трифторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он	531

3		1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он	517
4		1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он	517
5		1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он	463
6		(E)-1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он	518

7		(Z)-1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он	518
7x		1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-бутил-2-ин-1-он	475

Примечание: Если присутствуют различия между структурой и наименованием, структура имеет преимущество.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

фигура 1-А: Противоопухолевый эффект множественных доз соединений **1** и **3** на объем опухоли в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 1-В: Противоопухолевый эффект соединений **1** и **3** на массу опухоли в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 2: Противоопухолевый эффект соединений **3**, **15** и их комбинации в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 3: Противоопухолевый эффект соединений **3**, **8**, **15** и их комбинаций в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 4: Противоопухолевый эффект соединений **3**, **14**, **16** и их комбинаций в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 5: Противоопухолевый эффект соединений **3**, **14**, **15** и их комбинации в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышах SCID

фигура 6: Противоопухолевый эффект соединений **3, 14, 15** и их комбинаций в модели ксенотрансплантата лимфомы DoHH-2 на мышцах SCID

фигура 7: Противоопухолевый эффект соединений **3, 14, 15** и их комбинации в модели ксенотрансплантата лимфомы DoHH-2 на мышцах SCID

фигура 8: Противоопухолевый эффект соединений **3** и **9** в модели устойчивой ESU-DLCL2 на мышцах

фигура 9: Противоопухолевый эффект соединений **3, 14, 15** и их комбинации в модели устойчивой ESU-DLCL2 на мышцах.

фигура 10: Противоопухолевый эффект соединений **3, 14, 15** и их комбинации «3-в-1» в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышцах

фигура 11: Противоопухолевый эффект соединений **3, 14, 15** и соединений **9, 14, 15** и их комбинации «3-в-1» в модели ксенотрансплантата лимфомы DoHH-2 на мышцах

фигура 12: Противоопухолевый эффект соединений **3, 8, 12** и их комбинаций «2-в-1» и «3-в-1» в модели ксенотрансплантата лимфомы TMD-8 на мышцах

фигура 13: объем лапы - индуцированный адъювантом артрит

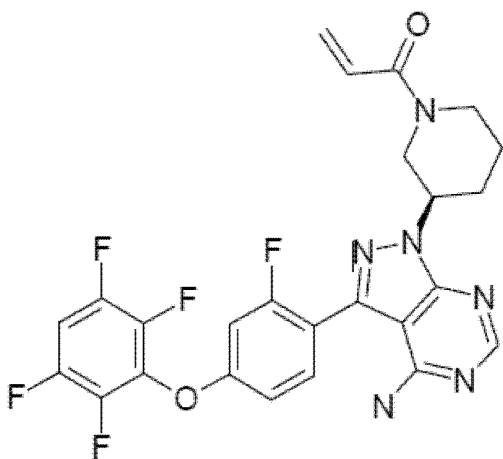
фигура 14: гистопатология - индуцированный адъювантом артрит

фигура 15: клинический обзор - индуцированный коллагеном артрит

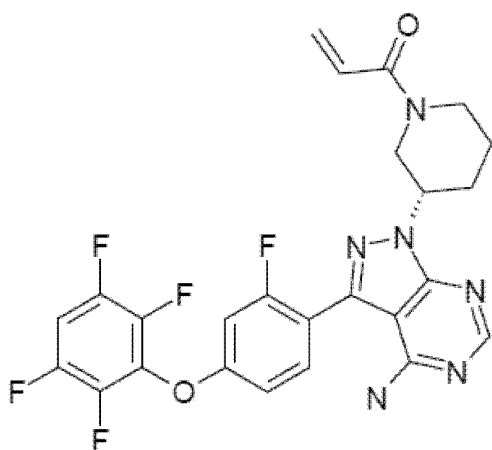
фигура 16: гистопатология - индуцированный коллагеном артрит

Пример 1

Соединение 1 и соединение 2

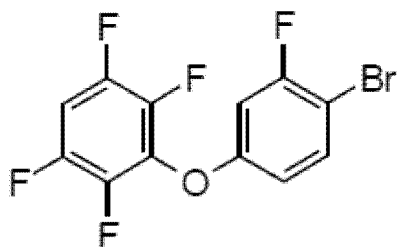


1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-трифторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он



1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-трифторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Стадия А:



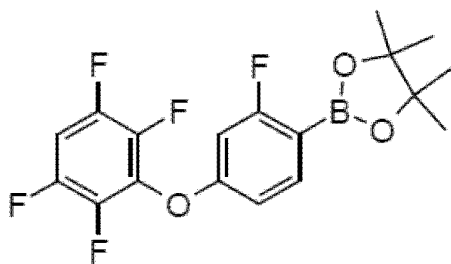
3-(4-бром-3-фторфенокси)-1,2,4,5-тетрафторбензол

Способ:

Карбонат калия (68,0 г, 492,1 ммоль, 2,0 экв.) и соединение 1,2,3,4,5-пентафторфенил (49,6 г, 295,3 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору 3-фтор-4-бромфенола (47,0 г, 246,1 ммоль,

1,0 экв.) в DMF (500 мл). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Осадок растворяли в этилацетате (300 мл), промывали водой (100 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (78 г, выход: 93%).

Стадия В:

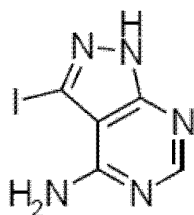


2-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан

Способ:

3-(4-бром-3-фторфенокси)-1,2,4,5-тетрафторбензол (73 г, 215,3 ммоль, 1,0 экв.), бис-пинаколатоборонат (65,6 г, 258,4 ммоль, 1,2 экв.), ацетат калия (31,6 г, 322,9 ммоль, 1,5 экв.) и (dppf)PdCl₂ (9,4 г, 12,8 ммоль, 0,06 экв.) добавляли к 1,4-диоксану (1 л). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 14 часов под азотом. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир) с получением указанного в заголовке соединения (60 г, выход: 72%).

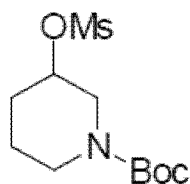
Стадия С:



3-иод-1Н-пиразоло [3,4-d] пиримидин-4-амин

Способ:

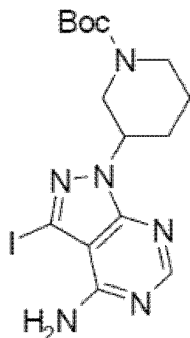
NIS (250 г, 1,11 моль, 1,5 экв.) добавляли к раствору 1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (100 г, 0,74 моль, 1,0 экв.) в DMF (800 мл). Реакционную смесь перемешивали при 80~85°C в течение 16 часов под азотом. Реакционную смесь фильтровали. Отфильтрованный осадок промывали этанолом (1000 мл x 3) с получением указанного в заголовке соединения (184 г, выход: 95%).

Стадия D:

трет-бутил 3-(метилсульфонилокси)пиперидин-1-карбоксилат

Способ:

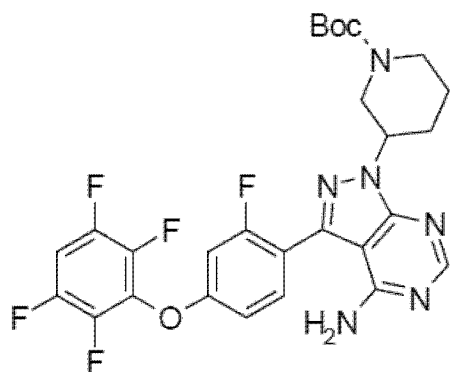
Триэтиламин (15 г, 150 ммоль, 3,0 экв.) и метансульфонилхлорид (6,3 г, 55 ммоль, 1,1 экв.) последовательно добавляли по каплям в раствор 3-гидроксипиперидин-1-карбоксилата (10,0 г, 50 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 часа, и затем реакцию останавливали насыщенным NaHCO₃ (100 мл). Полученную смесь экстрагировали дихлорметаном (200 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (13 г, выход: 95%).

Стадия E:

трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-карбоксилат

Способ:

Карбонат цезия (20,2 г, 62 ммоль, 2,0 экв.) и 3-(метилсульфонилокси)пиперидин-1-карбоксилат (13 г, 46,5 ммоль, 1,5 экв.) добавляли к раствору 3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]-пиримидин-4-амина (8,1 г, 31 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (50 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (5 г, выход: 25%).

Стадия F:

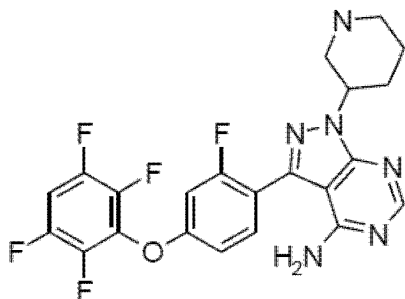
трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-карбоксилат

Способ:

Трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-карбоксилат (7,6 г, 17,1 ммоль, 1,0 экв.), 2-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (8,6 г, 22,3 ммоль, 1,3 экв.), фосфат калия (7,3 г, 34,2 ммоль, 2,0 экв.), и Pd-118 (0,56 г, 0,855 ммоль, 0,05 экв.) добавляли к смеси 1,4-диоксана/воды (5/1, об./об., 240 мл). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 12 часов в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь выливали в ледяную воду (300 мл) и затем экстрагировали этилацетатом (100 мл x 4). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия, и концентрировали для получения неочищенного продукта, который

очищали разделением посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (6,8 г, выход: 69%).

Стадия G:

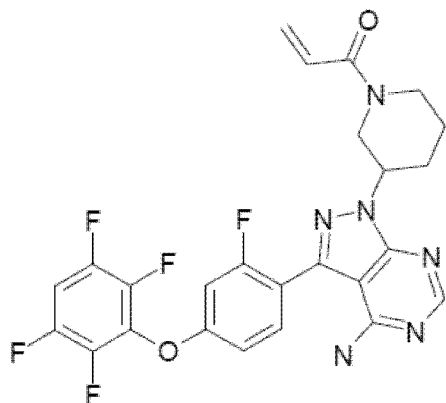


3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-(пиперидин-3-ил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин

Способ:

HCl/EA (20 мл, 4 моль/л) добавляли к раствору трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-карбоксилата (6,8 г, 11,8 ммоль) в этилацетате (50 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, и затем концентрировали с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (5,2 г, выход: 86%).

Стадия H:



1-(3-(4-амино-3-(2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он

Способ:

Триэтиламин (887 мг, 8,7 ммоль, 3,0 экв.) и акрилоилхлорид (0,26 г, 2,9 ммоль, 1,0 экв.) последовательно добавляли по каплям к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-

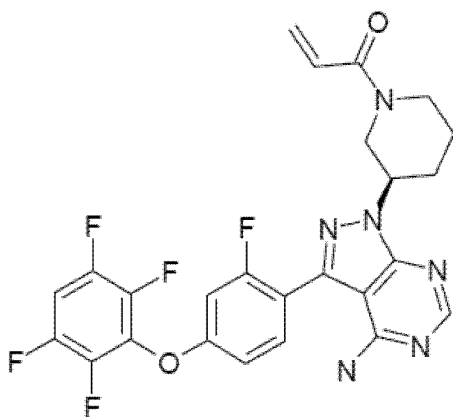
1-(пиперидин-3-ил)-1H-пирозоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (1,5 г, 2,9 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, реакцию останавливали водой (5 мл), разводили дихлорметаном (50 мл) и промывали водой (30 мл x 2) и насыщенным соевым раствором (30 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем с получением указанного в заголовке соединения (элюент: петролейный эфир: этилацетат=1:0 ~ 1:1) (0,94 г, выход: 64%).

Спектроскопические данные:

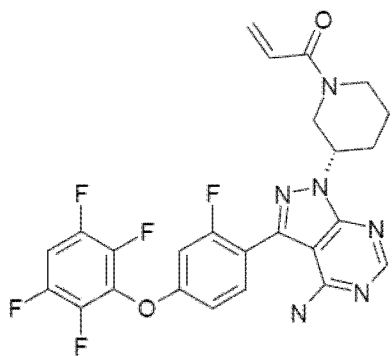
LC/MS (способ: UFLC): RT=3,130 мин; масса/заряд=531,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,22 (с, 1H), 8,00-7,91 (м, 1H), 7,55-7,46 (м, 1H), 7,27 (дд, J=2,4, 10,8 Гц, 1H), 7,12 (дд, J=2,4, 8,8 Гц, 1H), 6,88-6,65 (м, 1H), 6,13-6,02 (м, 1H), 5,70-5,56 (м, 1H), 4,71-4,65 (м, 1H), 4,54-4,51 (м, 0,5H), 4,20-4,17 (м, 1H), 4,07-4,04 (м, 0,5H), 3,67-3,60 (м, 0,5H), 3,17-3,12 (м, 1H), 2,98-2,94 (м, 0,5H), 2,26-2,21 (м, 1H), 2,11-2,06 (м, 1H), 1,92-1,89 (м, 1H), 1,58-1,54 (м, 1H).

Стадия I:



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пирозоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он



1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Способ:

1-[3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он (750 мг) разделяли посредством хирального разделения SFC (CO₂:C₂H₅OH (0,2%DEA), об./об., 200 мл/мин) с получением соединения **1** 1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-она (280 мг, э.и.: 100%) и соединения **2** 1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-она (330 мг, э.и.: 98%).

Спектроскопические данные:

Соединение 1:

LC/MS (способ: UFLC): RT=3,002 мин; масса/заряд=531,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,36 (с, 1H), 7,58 (т, J=8,4 Гц, 1H), 7,09-7,04 (м, 1H), 6,94-6,88 (м, 2H), 6,62-6,54 (м, 1H), 6,32-6,25 (м, 1H), 5,73-5,63 (м, 1H), 5,56-5,51 (м, 1H), 4,90-4,85 (м, 1,5H), 4,59-4,56 (м, 0,5H), 4,21-4,17 (м, 0,5H), 4,04-4,01 (м, 0,5H), 3,76-3,71 (м, 0,5H): 3,40-3,35 (м, 0,5H), 3,22-3,15 (м, 0,5H), 2,93-2,87 (м, 0,5H), 2,39-2,27 (м, 2H), 2,04-1,68 (м, 2H).

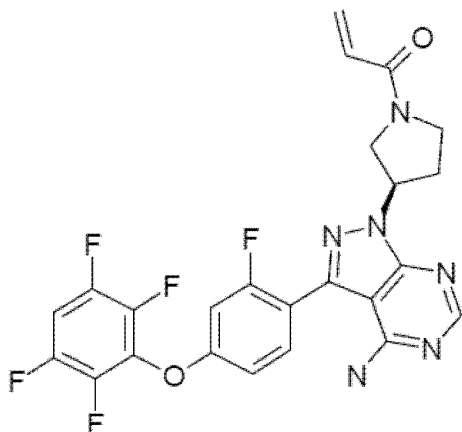
Соединение 2:

LC/MS (способ: UFLC): RT=3,006 мин; масса/заряд=531,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,24 (с, 1H), 7,62 (т, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,50-7,45 (м, 1H), 7,09-7,01 (м, 2H), 6,85-6,63 (м, 1H), 6,21-6,09 (м, 1H), 5,77-5,61 (м, 1H), 4,63-4,59 (м, 1H), 4,23-4,07 (м, 1,5H), 3,90-3,85 (м, 0,5H), 3,51-3,45 (м, 0,5H), 3,34-3,17 (м, 1,5H), 2,40-2,23 (м, 2H), 2,08-2,05 (м, 1H), 1,75-1,71 (м, 1H).

Пример 2

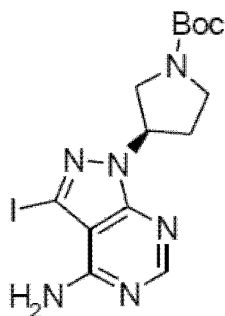
Соединение 3



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Способ 1:

Стадия А:



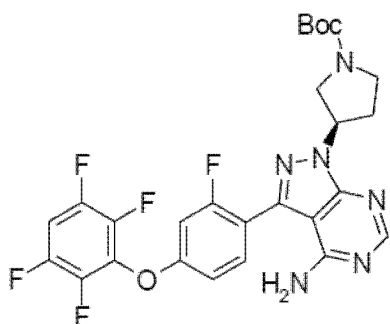
(R)-трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

DIAD (27,6 г, 137,5 ммоль, 1,5 экв.) добавляли по каплям к смеси 3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (24 г, 92 ммоль, 1,0 экв.), (S)-трет-бутил 3-гидрокси-пирролидин-1-карбоксилата (26 г, 137,5 ммоль, 1,5 экв.) и PPh_3 (36 г, 137,5 ммоль, 1,5 экв.)

экв.) в тетрагидрофуране (720 мл) при 0°C и в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После удаления растворителя при пониженном давлении, ацетонитрил (200 мл) добавляли к осадку. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов и фильтровали. Отфильтрованный осадок промывали ацетонитрилом (20 мл) и высушивали с получением указанного в заголовке соединения (25 г, выход: 63%).

Стадия В:

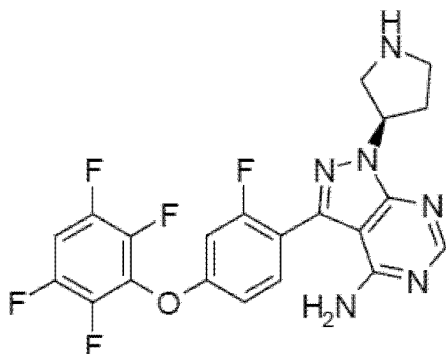


(3R)-трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

(R)-трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-карбоксилат (25 г, 58 ммоль, 1,0 экв.), 2-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (30 г, 75,4 ммоль, 1,3 экв.), фосфат калия (25 г, 116 ммоль, 2,0 экв.), и Pd-118 (750 мг, 1,16 ммоль, 0,02 экв.) добавляли к смеси 1,4-диоксана/воды (5/1, об./об., 600 мл). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение ночи в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Воду (300 мл) добавляли к осадку, затем экстрагировали этилацетатом (300 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (60 г, неочищенного).

Стадия С:

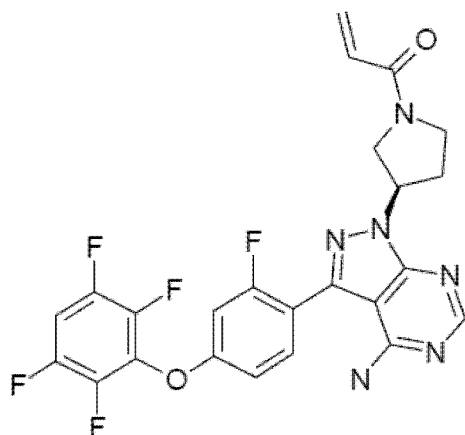


3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-((R)-
пирролидин-3-ил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин

Способ:

HCl/EA (100 мл, 4 моль/л) добавляли к раствору (3R)-трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилата (60 г, неочищенного) в этилацетате (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и концентрировали досуха для получения соли гидрохлорида указанного в заголовке соединения. Воду (500 мл) добавляли в реакционную колбу, проводили экстракцию этилацетатом (300 мл x 3). Водную фазу доводили до pH=9, и затем экстрагировали этилацетатом (300 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (24 г, выход двух стадий: 90%).

Стадия D:



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Способ:

NaOH (10%, 94 мл) добавляли к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-[(R)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (23,5 г, 50,75 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (470 мл) при -5°C, и затем акрилоилхлорид (5,97 г, 66 ммоль, 1,3 экв.) добавляли по каплям. Реакционную смесь перемешивали при -5°C в течение 1 часа, реакцию останавливали насыщенным соевым раствором (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (200 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир: этилацетат=1:3 ~ 1:1). Полученный продукт растворяли в метаноле (500 мл) и фильтровали. Воду (1500 мл) добавляли к перемешанному фильтрату, перемешивали в течение 2 часов и фильтровали. Отфильтрованный осадок сушили при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (16,5 г, выход: 63%).

Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=3,764 мин; масса/заряд=517,0 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,45 (с, 1H), 7,70 (т, J=8,4 Гц, 1H), 7,55-7,46 (м, 1H), 7,12-7,05 (м, 2H), 6,70-6,55 (м, 1H), 6,33-6,26 (м, 1H), 5,81-5,75 (м, 1H), 4,23-3,83 (м, 5H), 2,68-2,55 (м, 2H).

Способ 2:

Способ:

NaOH (216 мг, 5,40 ммоль, 2,5 экв.) добавляли к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-[(R)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (1,0 г, 2,16 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (50 мл) и воде (10 мл) при 0°C, и затем раствор хлорпропионилхлорида (288 мг, 2,27 ммоль, 1,05 экв.) в

тетрагидрофуране (10 мл) добавляли по каплям. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, затем при 60°C в течение 12 часов. После охлаждения до комнатной температуры, добавляли насыщенный солевой раствор (10 мл), и затем экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир: этилацетат=1:3 ~ 1:1) с получением соединения **3** (0,8 г, выход: 71%).

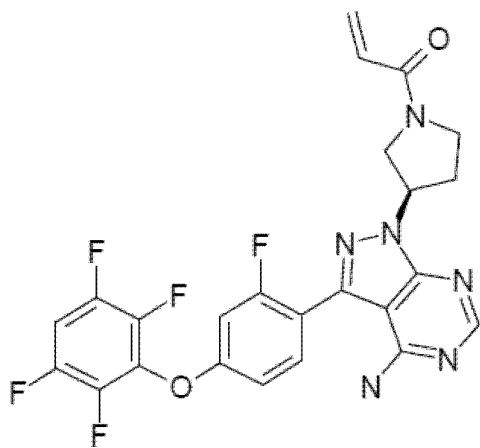
Способ 3:

Способ:

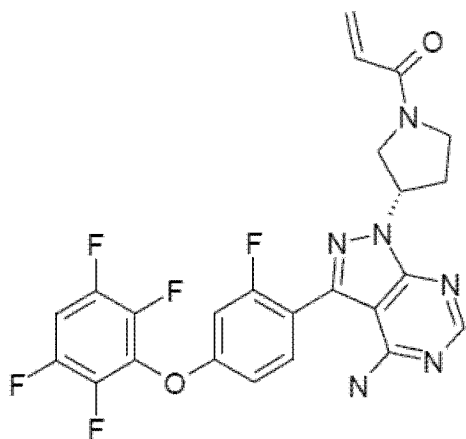
(R) - [3 - (4 - амино - 3 - иод - 1H - пиразоло [3,4-d] пиримидин - 1 - ил) пирролидин - 1 - ил] проп - 2 - ен - 1 - он (100 г, 0,26 ммоль, 1,0 экв.), 2 - [2 - фтор - 4 - (2,3,5,6 - тетрафторфенокси) фенил] - 4,4,5,5 - тетраметил - 1,3,2 - диоксаборолан (120 мг, 0,31 ммоль, 1,2 экв.), карбонат натрия (55 мг, 0,52 ммоль, 2,0 экв.) и Pd (PPh₃)₄ (30 мг, 0,026 ммоль, 0,01 экв.) добавляли к смеси 1,4 - диоксана / воды (5 мл, 1/1, об./об.). Реакционную смесь перемешивали под микроволновым излучением при 80°C в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством разделения ВЭЖХ на колонке C18 (подвижная фаза: ацетонитрил / вода / 0,5% HCl, градиент элюента от 10% до 100% (соотношение по объему)). После удаления летучего растворителя, желательную фракцию лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (38 мг, выход: 28%).

Способ 4:

Соединение 3 и соединение 4

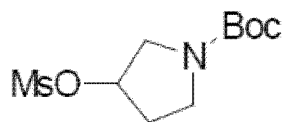


1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он



1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Стадия А:



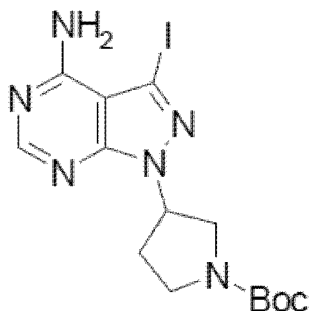
трет-бутил 3-(метилсульфонилокси)пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

Триэтиламин (35 г, 346 ммоль, 2,1 экв.) добавляли к раствору 3-гидрокси-пирролидин-1-карбоксилата (30,0 г, 163 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (200 мл) при 0°C, и затем метилхлорид (36,6 г, 321 ммоль, 1,9 экв.) добавляли по каплям. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 часов, реакцию

останавливали водой (20 мл), промывали водой (100 мл x 2) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (45,6 г, выход: 100%).

Стадия В:

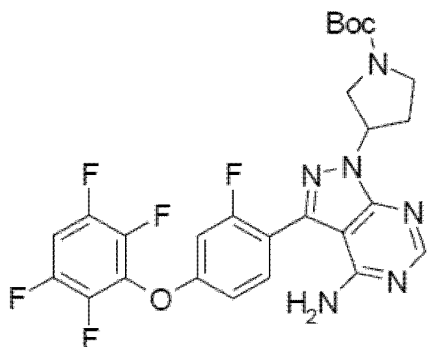


трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

Карбонат цезия (37 г, 115 ммоль, 3,0 экв.) и соединение 3-иод-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (10 г, 38 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору трет-бутил-3-(метилсульфонилокси)пирролидин-1-карбоксилата (35 г, 134 ммоль, 3,5 экв.) в DMF (300 мл). Реакционную смесь перемешивали при 85°C в течение 12 час. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтровали. Фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элuent: петролейный эфир: этилацетат=1:1) с получением указанного в заголовке соединения (7,0 г, выход: 44%).

Стадия С:

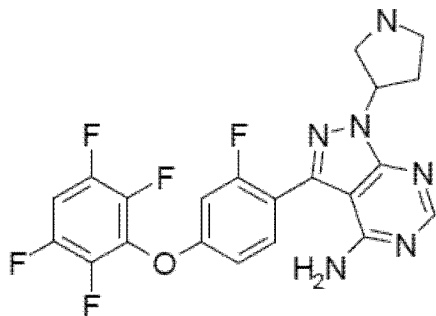


трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

Трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-карбоксилат (8 г, 18 ммоль, 1,0 экв.), 2-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (10,7 г, 27 ммоль, 1,5 экв.), фосфат калия (7,6 г, 36 ммоль, 2,0 экв.) и Pd-118 (1,2 г, 1,8 ммоль, 0,1 экв.) добавляли к смеси 1,4-диоксана/воды (180 мл, 5/1, об./об.). Реакционную смесь помещали под азот и перемешивали при 60°C в течение 14 часов. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь выливали в ледяную воду (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: этилацетат: петролейный эфир=1:1) с получением указанного в заголовке соединения (2,5 г, выход: 25%).

Стадия D:



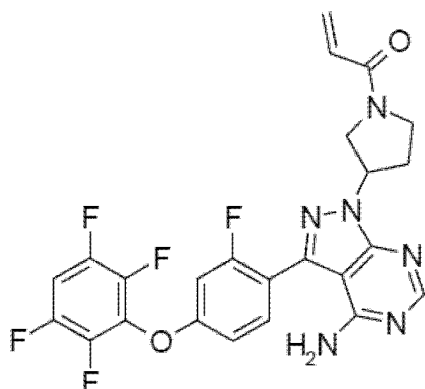
3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-(пирролидин-3-ил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин

Способ:

HCl/EA (20 мл, 4 моль/л) добавляли к раствору трет-бутил-3-[2-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилата (2,5 г, 4,4 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре и затем

концентрировали под давлением с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (2,2 г, выход: 100%).

Стадия Е:



1-[3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

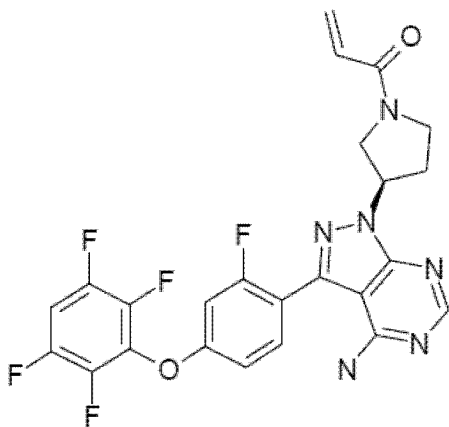
Способ:

Триэтиламин (1,4 г, 12,8 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-(пирролидин-3-ил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (2,2 г, 4,4 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (50 мл), затем акрилоилхлорид (0,38 г, 4,2 ммоль, 0,95 экв.) добавляли по каплям при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, и реакцию останавливали водой (30 мл). Водную фазу экстрагировали метиленхлоридом (30 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (1,0 г, выход: 45%).

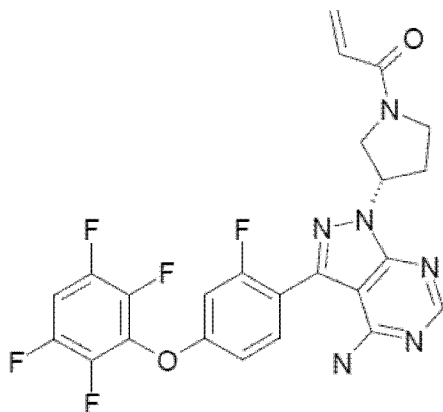
Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=2,810 мин; масса/заряд=517,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

Стадия F:



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он



1-[(S)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Способ:

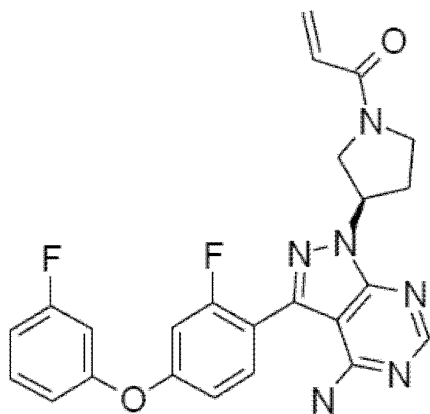
Рацемат 1-[3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-она разделяли посредством хирального разделения SFC с получением соединения **3** (270 мг) и соединения **4** (320 мг).

Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=2,808 мин; масса/заряд=517,1 [M+N]⁺; Общее время проведения=7 мин.

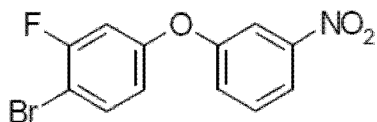
Пример 3

Соединение 5



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Стадия А:

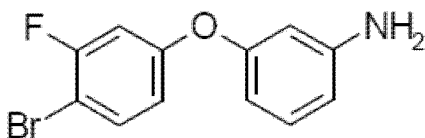


1-(3-фтор-4-бром-фенокси)-3-бензол

Способ:

1-фтор-3-нитробензол (29,6 г, 210 ммоль, 1,0 экв.) и карбонат калия (58 г, 420 ммоль, 2,0 экв.) добавляли к раствору 3-фтор-4-бромфенола (40 г, 210 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (400 мл). Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 12 часов в атмосфере азота. После удаления растворителя при пониженном давлении, воду (300 мл) добавляли к осадку и затем экстрагировали этилацетатом (300 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (65 г, выход: 100%).

Стадия В:



3-(3-фтор-4-бром-фенокси)бензоламин

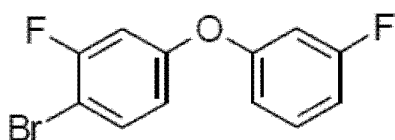
Способ:

Хлорид аммония (28 г, 525 ммоль, 2,5 экв.) и порошок железа (58,8 г, 1,05 моль, 5,0 экв.) добавляли к раствору 1-бром-2-

фтор-4-(3-нитрофенокси)бензола (65 г, 210 ммоль, 1,0 экв.) в этаноле (300 мл) и воде (60 мл). Реакционный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 12 часов под азотом. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством обращеннофазовой ВЭЖХ на колонке C18 (подвижная фаза: ацетонитрил/вода/0,7% NH_4HCO_3 , градиент элюента 10%-100% (соотношение по объему)).

После удаления летучего растворителя, желательную фракцию лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (19 г, выход: 23%).

Стадия С:

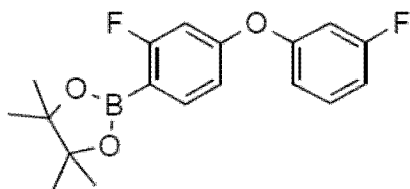


1-бром-2-фтор-4-(3-фторфенокси)бензол

Способ:

3-(3-фтор-4-бром-фенокси)бензоламин (9 г, 32 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору пиридина - фторида водорода (30 мл) порциями при -10°C . Полученную реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут, охлаждали до -10°C , и затем нитрит натрия (2,42 г, 35 ммоль, 1,1 экв.) добавляли порционно. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 30 минут, затем при 60°C в течение 14 часов. После охлаждения до комнатной температуры, смесь выливали в ледяной этанол (50 мл), разводили насыщенным раствором NaHCO_3 (50 мл), и затем экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир) с получением указанного в заголовке соединения (5,8 г, выход: 64%).

Стадия D:

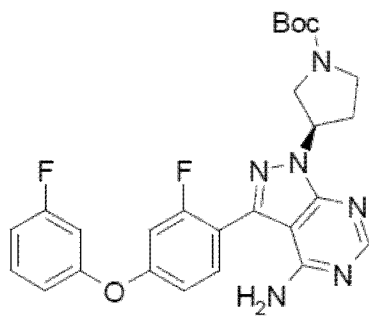


2-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан

Способ:

1-бром-2-фтор-4-(3-фторфенокси)бензол (5,8 г, 20 ммоль, 1,0 экв.), бис-пинаколатоборонат (6,1 г, 24 ммоль, 1,2 экв.), ацетат калия (3,9 г, 40 ммоль, 2,0 экв.) и [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (0,89 г, 1,2 ммоль, 0,06 экв.) растворяли в 1,4-диоксане (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при 85°C в течение 14 часов в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир) с получением указанного в заголовке соединения (6,5 г, выход: 100%).

Стадия Е:



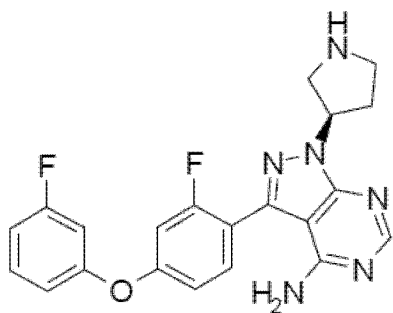
(3R)-трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилат

Способ:

(R)-трет-бутил-3-(4-амино-3-иод-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-карбоксилат (6,5 г, 15,0 ммоль, 1,0 экв.), 2-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (6,5 г, 19,6 ммоль, 1,3 экв.), фосфат калия (6,4 г, 30,1 ммоль, 2,0 экв.) и Pd-118 (0,25 г, 0,39 ммоль, 0,01

экв.) добавляли к смеси 1,4-диоксана/воды (16 мл, 1/1, об./об.). Полученную смесь перемешивали при 85°C в течение 12 часов в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь разбавляли водой (50 мл), и затем экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (4,2 г, выход: 55%).

Стадия F:

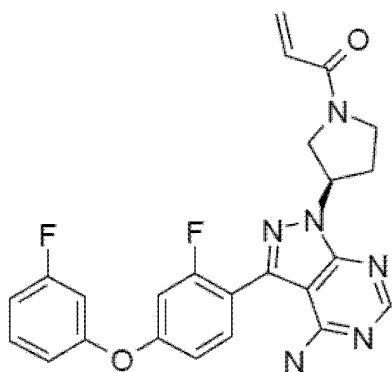


3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1-[(R)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин

Способ:

HCl/EA (10 мл, 4 моль/л) добавляли к раствору (3R)-трет-бутил-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-карбоксилата (4,2 г, 8,27 ммоль) в дихлорметане (15 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, и затем концентрировали при пониженном давлении с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (3,7 г, выход: 92%).

Стадия G:



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

Способ:

Гидроксид натрия (10%, 15,3 мл) и акрилоилхлорид (0,67 г, 7,44 ммоль, 0,9 экв.) последовательно добавляли по каплям к раствору 3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1-[(R)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (3,7 г, 8,27 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут, реакцию останавливали насыщенным NaHCO₃ (20 мл) и экстрагировали дихлорметаном (30 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: петролейный эфир: этилацетат=1:0 до 1:1) с получением указанного в заголовке соединения (2,5 г, выход: 65%).

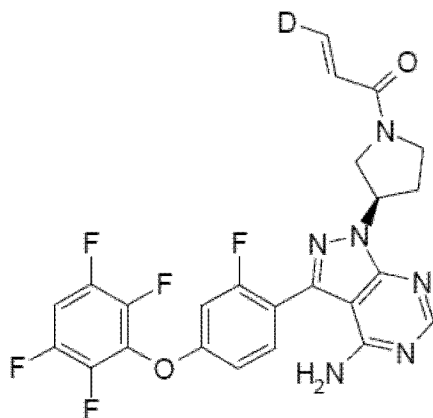
Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=3,178 мин; масса/заряд=463,0 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,36 (с, 1H), 7,53-7,49 (м, 1H), 7,40-7,35 (м, 1H), 6,95-6,81 (м, 4H), 6,41-6,39 (м, 2H), 5,69-5,55 (м, 3H), 4,14-3,98 (м, 3H), 3,78-3,72 (м, 1H), 2,71-2,54 (м, 2H).

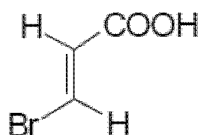
Пример 4

Соединение 6



(*E*)-1-[(*R*)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он

Стадия А:



(*E*)-3-бромакриловая кислота

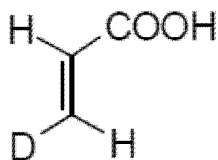
Способ:

Смесь пропиоловой кислоты (1 г, 14,28 ммоль, 1,0 экв.) и HBr (40% водный раствор, 1,7 мл, 0,88 экв.) перемешивали в течение ночи при 140°C . Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт кристаллизовали из воды (4 мл x 3) с получением указанного в заголовке соединения (0,76 г, выход: 35%).

Спектроскопические данные:

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,76 (д, $J=14$ Гц, 1H), 6,55 (д, $J=14$ Гц, 1H).

Стадия В:



(*E*)-3-дейтерийакриловая кислота

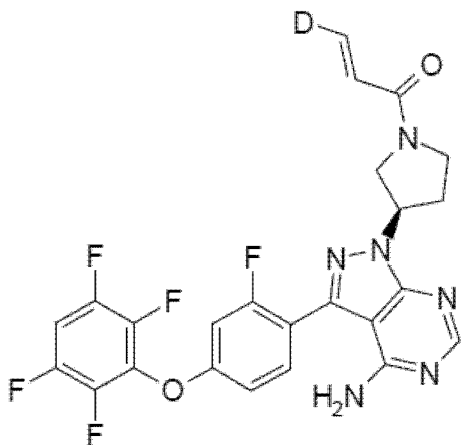
Способ:

Na-Hg (6 г, 49,67 ммоль, 2,5 экв.) добавляли к раствору (*E*)-3-бромакриловой кислоты (3 г, 19,87 ммоль, 1,0 экв.) в D₂O (30 мл) при 0 ~ 5°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 36 часов. Водную фазу доводили до pH=5 с использованием 1 М соляной кислоты, и затем экстрагировали диэтиловым эфиром (20 мл x 5). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (0,52 г, выход: 36%).

Спектроскопические данные:

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,76 (д, *J*=17,2 Гц, 1H), 6,55 (д, *J*=17,2 Гц, 1H).

Стадия С:



(*E*)-1-[(*R*)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он

Способ:

(*E*)-3-дейтерийакриловую кислоту (76 мг, 1,08 ммоль, 1,0 экв.), НАТУ (530 мг, 1,40 ммоль, 1,3 экв.) и *N,N*-диизопропилэтиламин (419 мг, 3,24 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-[(*R*)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (500 мг, 1,08 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (50 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали разделением посредством обращеннофазовой ВЭЖХ-на колонке

C18 (устройство: LC 8A & Gilson 215, колонка с коллектором фракций: Synergi Max-RP 150*30 мм*4μ, подвижная фаза А: вода (0,5% HCl), подвижная фаза В: ацетонитрил, скорость потока: 30 мл/мин, градиент В: 36%~37%, 0-17 минут). После удаления летучего растворителя, желательную фракцию лиофилизировали с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (76 мг, выход: 13%).

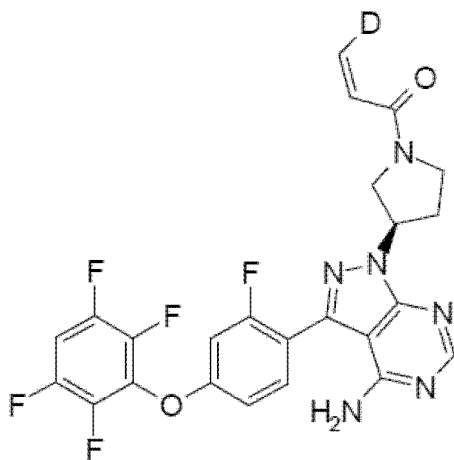
Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=2,765 мин; масса/заряд=518,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,41 (с, 1H), 7,66 (т, J=8,4 Гц, 1H), 7,51-7,44 (м, 1H), 7,09-7,01 (м, 2H), 6,66-6,56 (м, 1H), 6,28-6,23 (м, 1H), 5,75-5,66 (м, 1H), 4,19-4,16 (м, 1H), 4,06-4,02 (м, 1,5H), 3,89-3,85 (м, 1H), 3,78-3,72 (м, 0,5H), 2,63-2,49 (м, 2H).

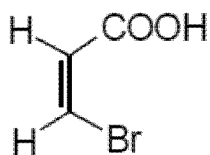
Пример 5

Соединение 7



(Z)-1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он

Стадия А:



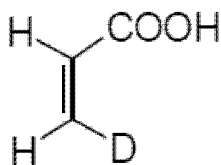
(Z)-3-бромакриловая кислота

Способ:

Смесь пропиоловой кислоты (1 г, 14,28 ммоль, 1,0 экв.) и HBr (40% водный раствор, 1,7 мл, 0,88 экв.) перемешивали в течение ночи при 55°C. Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт кристаллизовали из петролейного эфира (4 мл x 3) с получением указанного в заголовке соединения (0,3 г, выход: 14%).

Спектроскопические данные:

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,16 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,67 (д, J=8,4 Гц, 1H)

Стадия В:

(Z)-3-дейтерийакриловая кислота

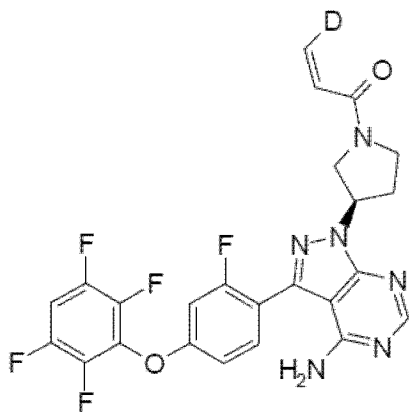
Способ:

Na-Hg (6 г, 49,67 ммоль, 2,5 экв.) добавляли к раствору (Z)-3-бромакриловой кислоты (3 г, 19,87 ммоль, 1,0 экв.) в D₂O (30 мл) при 0 ~ 5°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 36 часов. Водную фазу доводили до pH=5 1M соляной кислотой, и затем экстрагировали диэтиловым эфиром (20 мл x 5). Объединенные органические фазы сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (0,34 г, выход: 23%).

Спектроскопические данные:

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,14 (д, J=10,4 Гц, 1H), 5,96 (д, J=10,4 Гц, 1H).

Стадия С:



(Z)-1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-3-ил]-3-дейтерий-проп-2-ен-1-он

Способ:

(Z)-3-дейтерийакриловую кислоту (151 мг, 2,16 ммоль, 1,0 экв.), НАТУ (1,06 г, 2,80 ммоль, 1,3 экв.) и N,N-диизопропилэтиламин (838 мг, 6,48 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к раствору 3-[2-фтор-4-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)фенил]-1-[(R)-пирролидин-3-ил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (1,0 г, 2,16 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (50 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, и концентрировали для получения неочищенного продукта, который очищали разделением посредством обращеннофазовой ВЭЖХ- на колонке C18 (устройство: LC 8A & Gilson 215, колонка с коллектором фракций: Synergi Max-RP 150*30 мм*4μ, подвижная фаза А: вода (0,5% HCl), подвижная фаза В: ацетонитрил, скорость потока: 30 мл/мин, градиент В: 36%~37%, 0~17 минут). После удаления летучего растворителя, желательную фракцию лиофилизировали с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (228 мг, выход: 20%).

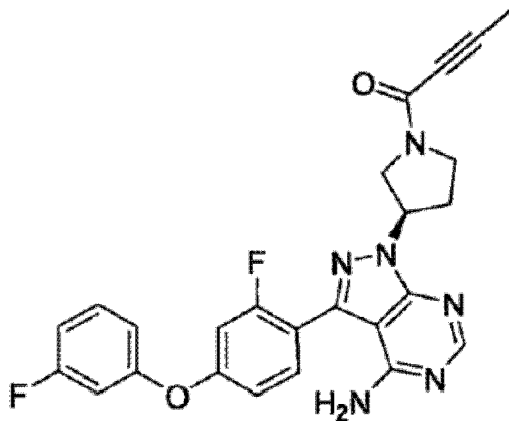
Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=2,775 мин; масса/заряд=518,1 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,45 (с, 1H), 7,70 (т, J=8,4 Гц, 1H), 7,52-7,46 (м, 1H), 7,13-7,05 (м, 2H), 6,71-6,61 (м, 1H), 5,80-5,73 (м, 2H), 4,23-4,20 (м, 1H), 4,09-4,04 (м, 1,5H), 3,93 3,90 (м, 1H), 3,80-3,75 (м, 0,5H), 2,67-2,56 (м, 2H).

Пример 6

Соединение 7х



1-[(R)-3-[4-амино-3-[2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил]-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пирролидин-1-ил]-бутил-2-ин-1-он

Способ:

2-бутиновую кислоту (41,17 мг, 489,72 мкмоль, 1,00 экв.), НАТУ (93,10 г, 244,86 мкмоль, 0,50 экв.) и DIPEA (75,95 мг, 587,66 мкмоль, 102,64 мкл, 1,20 экв.) добавляли последовательно к раствору 3-(2-фтор-4-(3-фторфенокси)фенил)-1-((R)-пирролидин-3-ил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амина (200,00 г, 489,72 мкмоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (5,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре 15-18°C в течение 2 часов, и затем концентрировали и высушивали в барабанной сушилке для получения неочищенного продукта, который очищали разделением посредством обращеннофазовой ВЭЖХ на колонке C18 (подвижная фаза: ацетонитрил/вода/0,5% HCl, градиентная элюция от 22% до 52% (соотношение по объему)). После удаления летучих компонентов выпариванием при пониженном давлении, желательную фракцию лиофилизировали с получением гидрохлорида указанного в заголовке соединения (82 мг, выход: 33%).

Спектроскопические данные:

LC/MS (способ: UFLC): RT=3,057 мин; масса/заряд=475,0 [M+H]⁺; общее время проведения=7 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,92 (с, 1H), 8,34 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,56 (ушир., 1H), 7,41-7,36 (м, 1H), 7,00-6,86 (м, 5H), 6,58 (ушир., 1H), 5,62-5,58 (м, 1H), 4,22-3,74 (м, 4H), 2,65-2,50 (м, 2H), 2,02-1,96 (м, 3H).

Анализ *in vitro*

Анализ ингибирования активности киназы ВТК:

Ферментная реакционная смесь ВТК дикого типа для стандартного анализа HTRF содержала 1 нМ ВТК дикого типа, 1 мкМ пептид биотин-ТК1, 30 мкМ АТФ и 50 мМ HEPES в буфере. Ферментативные реакции проводили при комнатной температуре в течение 60 минут. 5 мкл 0,2 М ЭДТА добавляли для остановки реакции и затем ингибиторы (5 л) добавляли при конечных концентрациях 2 нМ антитело и 62,5 нМ XL665. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут и затем считывали в планшетном спектрофотометре Envision. Считывания трансформировали в % ингибирования посредством уравнения $(\text{Мин соотношение}) / (\text{Мах}-\text{Мин}) * 100\%$. Таким образом данные IC50 для тестируемых соединений получали с использованием подбора кривой по четырем параметрам.

Анализ подавления активности клеток опухоли:

Клетки опухолей (TMD-8, DoHH2 и WSU-DLCL2) переносили и прикрепляли к 96-луночным планшетам. Через одну ночь, добавляли пустой буфер и выбранные концентрации (0,01 нМ-100 мкМ) раствора тестируемого соединения. Через 48 часов инкубации, CellTiter-Go добавляли для лизиса клеток. Получали считывание люминесцентного сигнала и расчет процента подавления жизнеспособности клеток.

Анализ *in vivo*

Фармакокинетическое исследование на самцах крыс SD: самцов крыс SD для фармакокинетического исследования в течение 24 часов разделяли на две группы: внутривенного введения и перорального введения. Каждая группа насчитывала трех животных. Для группы внутривенного введения, образцы крови собирали перед дозированием, через 0,0833, 0,167, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 час после дозирования; для группы перорального введения, образцы крови собирали перед дозированием, через 0,167, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 час после дозирования. После сбора крови, применяли ВЭЖХ-MS/MS для определения концентраций соединения в плазме. Рассчитанные фармакокинетические параметры для группы внутривенного введения включают в себя среднее выведение из плазмы (CLp), средний кажущийся объем распределения в равновесном состоянии (Vdss),

площадь под кривой (AUC) за 0-24 час, среднее время удержания (MRT) за 0-24 час, время полужизни ($T_{1/2}$); рассчитанные фармакокинетические параметры для группы перорального введения включают в себя среднюю наивысшую концентрацию (C_{макс}), площадь под кривой (AUC) 0-24 час, 0-24 час среднее время удержания (MRT); среднюю относительную биодоступность для исследования.

Фармакокинетическое исследование на собаках породы бигль: собак породы бигль для фармакокинетического исследования в течение 24 часов разделяли на две группы: внутривенного введения (1 мг на килограмм) и перорального введения (3 мг на килограмм). Каждая группа насчитывала трех животных. Для группы внутривенного введения, образцы крови собирали перед дозированием, через 0,033, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 9, 24 час после дозирования; для группы перорального введения, образцы крови собирали перед дозированием, через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 9, 24 час после дозирования. После сбора крови, ВЭЖХ-MS/MS применяли для определения концентраций соединения в плазме. Рассчитанные фармакокинетические параметры для группы внутривенного введения включают в себя среднее выведение из плазмы (C_{lр}), средний кажущийся объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}), площадь под кривой (AUC) за 0-24 час, среднее время удержания (MRT) за 0-24 час, время полужизни ($T_{1/2}$); рассчитанные фармакокинетические параметры для группы перорального введения включают в себя среднюю наивысшую концентрацию (C_{макс}), площадь под кривой (AUC) за 0-24 час, среднее время удержания (MRT) за 0-24 час; среднюю относительную биодоступность для исследования.

Монотерапия и комбинированная терапия для подавления моделей опухолей TMD-8, DoHH2 или WSU-DLCL2 на животных:

Экспериментальные результаты демонстрируют, что эффективность совместного введения с синергическим эффектом в моделях чувствительной опухоли (TMD-8), невосприимчивой опухоли (DoHH-2), а также опухоли с множественной лекарственной устойчивостью (WSU-DLCL2), показана лучше, чем отдельный подавляющий эффект лекарственного средства.

Самок мышей CB-17SCID использовали для оценки соединений (**3**, **9**, **14** и других соединений, перечисленных в таблице) в модели ксенотрансплантата и оценивали совместный противоопухолевый эффект лекарственных средств. Клетки опухолей TMD-8, DoHH2, WSU-DLCL2 высевали в 10% среду RPMI-1640, содержащую инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку, и культивировали в условиях 37°C, 5% CO₂.

Клетки опухолей субкультивировали общепринятым способом дважды в неделю. Когда клетки находились в экспоненциальной фазе роста, их собирали и подсчитывали для инокуляции опухолей. В правый бок каждой мыши инокулировали подкожно суспензию клеток опухолей с 0,2 мл PBS (10×10^6) и матригелем (1/1). Средний объем опухоли составлял приблизительно 100–200 мм³ на начало введения. Каждая группа состояла из 6–10 мышей с единственной композицией. Тестируемая группа (включая контрольную группу, группу единственного лекарственного средства, группу совместного введения) получала predetermined дозу, введенную перорально, которую вводили непрерывно в течение 14 суток или 21 суток. В ходе эксперимента, объем опухоли и массу тела мыши измеряли один раз в каждые двое или трое суток.

Модель индуцированного коллагеном артрита:

Самцов мышей DBA/1 использовали в оценке модели индуцированного коллагеном артрита *in vivo* для оценки подавляющего эффекта комбинаций соединения **3** и соединения **14**. Мышей разделяли на 8 групп, включая контрольную группу, контрольную группу растворителя и пять групп обработки. Всех мышей (за исключением нормальной группы) иммунизировали на 0 и 21 сутки с использованием 200 мкг бычьего коллагена (II типа). Через семь суток после бустер-иммунизации (на сутки 28), у животных начали показывать симптомы заболевания, со средним клиническим показателем приблизительно 1. На те же самые сутки, иммунизированных мышей случайным образом разделяли на семь групп: соединение **3** (1,5 мг/кг) и соединение **14** (0,15 мг/кг), совместно вводимые дважды в сутки; соединение **3** (4,5 мг/кг) и соединение **14** (0,45 мг/кг), вводимые в комбинации дважды в

сутки; соединение **14** (0,15 мг/кг), совместно вводимое с соединением **3** (1,5 мг/кг), один раз в сутки; монотерапия соединением **3** (1,5 мг/кг), один раз в сутки; монотерапия соединением **14** (1,5 мг/кг), один раз в сутки; группа положительного контроля (0,2 мг/кг дексаметазона), и начинали введение. Пероральное введение проводили в течение двух недель, регистрировали массу и клинический показатель. По окончании исследования, животных подвергали эвтаназии и задние конечности собирали для гистопатологического анализа.

Модель индуцированного адъювантом артрита:

Самок крыс Lewis использовали для модели индуцированного коллагеном артрита на крысах для оценки подавляющего эффекта *in vivo* комбинированной терапии соединением **3** и соединением **14**. Всем крысам (за исключением контрольной группы) на сутки 0 проводили инъекцию в левую заднюю конечность полного адъюванта Фрейнда (CFA) для иммунизации. Через 6 суток после иммунизации, для некоторых крыс начали показывать клинические симптомы артрита, такие как покраснение и отек. Через 13 суток, животных повторно иммунизировали в комбинации из семи групп: контрольная группа растворителя, соединение **3** (5 мг/кг) и соединение **14** (0,5 мг/кг), совместно вводимые дважды в сутки; соединение **3** (15 мг/кг) и соединение **14** (1,5 мг/кг), совместно вводимые дважды в сутки; соединение **14** (3 мг/кг), совместно вводимое с соединением **3** (30 мг/кг), один раз в сутки; монотерапия соединением **3** (5 мг/кг), дважды в сутки; монотерапия соединением **14** (0,5 мг/кг), дважды в сутки; группа положительного контроля (соединение **11**, 3 мг/кг, дважды в сутки), и начинали введение. Пероральное введение проводили в течение трех недель, через сутки регистрировали массу, клинический показатель и объем лапы. По окончании исследования, животных умерщвляли для сбора правых задних лап, окрашивания HE для гистопатологического анализа.

Таблица 2. Данные ингибирования активности ВТК соединениями в примерах по настоящему изобретению

Пример	ВТК IC ₅₀ (мкМ)	Пример	ВТК IC ₅₀ (мкМ)	Пример	ВТК IC ₅₀ (мкМ)
1	0,002	2	0,023	3	0,0005
4	0,021	5	0,001		

Таблица 3. Подавление индивидуальными соединениями линии клеток TMD-8 (% подавл.)

Соединение	Наименование соединения (механизм)	% подавл.	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	0,01 мкМ
3	Соединение 3 (ВТК)	AVG	99,69	74,93	61,66	59,59	46,07
		SD	0,10	0,64	3,97	1,49	1,60
3	Соединение 3 (ВТК)	AVG			55,05	52,40	51,66
		SD			3,47	2,17	1,21
6	Соединение 6 (ВТК)	AVG	99,38	62,52	60,21	52,99	32,29
		SD	0,09	1,58	3,62	3,53	5,50
7	Соединение 7 (ВТК)	AVG	99,32	62,89	58,57	58,68	33,85
		SD	0,13	2,18	0,90	2,20	3,05
8	Иделалисиб (PI3K)	AVG	96,79	87,69	68,92	48,83	29,44
		SD	0,27	1,07	2,87	1,35	3,83
9	Ибрутиниб (ВТК)	AVG	99,93	81,41	66,11	59,14	56,16
		SD	0,01	2,27	2,07	1,77	2,47
10	Руксолитиниб (JAK1/2)	AVG			100,78	-5,53	0,05
		SD			0,05	10,51	10,00
11	Тофацитиниб (JAK3)	AVG			6,66	1,31	6,02
		SD			7,59	8,82	14,08
12	АВТ-199 Венетоклак (Bcl-2)	AVG			37,55	18,81	11,12
		SD			3,83	5,60	2,80
13	ОТС-964 (TOPK)	AVG			101,20	49,10	8,71
		SD			0,08	4,49	10,40
14	Эверолимус (mTOR)	AVG			68,59	67,64	65,55
		SD			1,71	2,76	2,35
15	Помалидомид (FMBD)	AVG			76,84	61,69	45,12
		SD			1,03	2,34	1,26
16	Леналидомид (IMiD)	AVG			94,21	21,04	7,43
		SD			0,46	5,67	2,61
17	Рапамицин (mTOR)	AVG			64,99	59,83	58,71
		SD			2,77	1,45	2,37
18	Метотрексат (антифолат)	AVG			39,55	32,04	-8,45
		SD			0,71	3,05	6,02
19	Церитиниб (ALK)	AVG					
		SD					

Примечание: Соединения 3, 6, 7, 8-19 в этой таблице соответствуют соответствующим «китайским или английским наименованиям соединений», как указано, где соединения 3, 6 и 7 относятся к соединениям в примерах по настоящему изобретению, в то время как соединения 8-19 относятся к соответствующим соединениям на известном уровне техники. Для краткости и удобства написания, идентификационный номер присвоен соответствующему соединению. Таким образом, идентификационные номера соединений далее в настоящем документе также имеют такое же значение.

Таблица 4. Подавление композицией «два в одном» линии клеток TMD-8 (% подавл.)

Соединение @ концентрация	% подавл.	3 @ 1 мкМ	3 @ 0,1 мкМ	3 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ	AVG	65,94	67,20	66,17
	SD	1,41	0,73	1,64
15 @ 0,1 мкМ	AVG	53,25	49,26	30,27
	SD	3,19	0,67	2,67
8 @ 0,1 мкМ	AVG	68,05	64,71	63,56
	SD	2,04	2,50	5,10
13 @ 0,1 мкМ	AVG	82,60	68,80	77,27
	SD	3,50	2,64	1,91
17 @ 0,1 мкМ	AVG	75,73	80,41	75,12
	SD	0,53	1,29	6,22
12 @ 0,1 мкМ	AVG	85,97	79,99	65,36
	SD	1,50	1,54	0,83
18 @ 0,1 мкМ	AVG	59,93	46,58	35,68
	SD	2,77	6,76	5,94
Соединение @ концентрация	% подавл.	8 @ 1 мкМ	8 @ 0,1 мкМ	8 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ	AVG	81,20	67,95	58,69
	SD	0,33	1,59	1,08
15 @ 0,1 мкМ	AVG	76,96	42,58	24,14
	SD	0,95	7,50	3,94
13 @ 0,1 мкМ	AVG	95,76	83,60	75,38
	SD	0,31	0,53	3,51
3 @ 0,1 мкМ	AVG	86,26	80,21	73,01
	SD	2,25	2,87	2,46
Соединение @ концентрация	% подавл.	13 @ 1 мкМ	13 @ 0,1 мкМ	13 @ 0,01 мкМ
8 @ 0,1 мкМ	AVG	99,31	47,73	48,71
	SD	0,06	2,52	4,50
14 @ 0,1 мкМ	AVG	99,46	59,47	60,30
	SD	0,11	0,73	1,44
15 @ 0,1 мкМ	AVG	99,09	8,82	12,97
	SD	0,17	3,93	4,84
3 @ 0,1 мкМ	AVG	99,16	97,60	52,43
	SD	0,42	0,19	1,07
Соединение @ концентрация	% подавл.	15 @ 1 мкМ	15 @ 0,1 мкМ	15 @ 0,01 мкМ
8 @ 0,1 мкМ	AVG	80,19	43,34	42,81
	SD	1,25	5,76	3,81
14 @ 0,1 мкМ	AVG	61,84	57,04	58,46
	SD	1,62	1,70	0,32

13 @ 0,1 мкМ	AVG	71,75	30,72	1,36
	SD	0,35	7,16	5,17
3 @ 0,1 мкМ	AVG	96,92	70,04	49,93
	SD	0,19	4,46	5,42
Соединение @ концентрация	% подавл.	18 @ 1 мкМ	18 @ 0,1 мкМ	18 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ	AVG	54,43	52,67	56,87
	SD	0,70	2,71	2,27
3 @ 0,1 мкМ	AVG	46,90	42,73	34,99
	SD	2,34	2,91	1,26
Соединение @ концентрация	% подавл.	9 @ 1 мкМ	9 @ 0,1 мкМ	9 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ	AVG	71,04	58,89	56,54
	SD	2,52	9,71	13,33
19 @ 0,1 мкМ	AVG	52,60	43,68	33,70
	SD	3,67	4,16	1,51
18 @ 0,1 мкМ	AVG	55,19	42,42	32,13
	SD	2,63	3,32	3,08

Из таблицы 4 можно видеть, что для фармацевтических комбинаций «два-в-одном» показано значительное подавление жизнеспособности клеток опухоли. Из них, для фармацевтических комбинаций соединения 8 плюс соединение 13, соединения 14 плюс соединение 13, соединения 15 плюс соединение 13 и соединения 3 плюс соединение 13 показано высоко эффективное подавление жизнеспособности клеток TMD-8.

Таблица 5. Подавление композицией «три в одном» линии клеток TMD-8 (% подавл.)

Соединение @ концентрация	% подавл.	3 @ 1 мкМ	3 @ 0,1 мкМ	3 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ +	AVG	76,42	80,77	83,22
	SD	4,50	1,38	0,37
15 @ 0,1 мкМ +	AVG	89,89	85,62	88,57
	SD	0,72	7,68	3,37
14 @ 0,1 мкМ +	AVG	93,44	94,73	94,65
	SD	0,55	0,92	1,11
8 @ 0,1 мкМ +	AVG	95,56	95,30	94,62
	SD	0,40	0,10	0,06
18 @ 0,1 мкМ +	AVG	66,44	71,70	58,27
	SD	8,75	1,91	2,80

Соединение @ концентрация	% подавл.	15 @ 1 мкМ	15 @ 0,1 мкМ	15 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ + 3 @ 0,1 мкМ	AVG	92,74	82,66	75,17
	SD	0,38	1,90	2,48
Соединение @ концентрация	% подавл.	8 @ 1 мкМ	8 @ 0,1 мкМ	8 @ 0,01 мкМ
14 @ 0,1 мкМ + 15 @ 0,1 мкМ	AVG	87,17	79,06	59,45
	SD	1,70	0,73	2,16
Соединение @ концентрация	% подавл.	13 @ 1 мкМ	13 @ 0,1 мкМ	13 @ 0,01 мкМ
15 @ 0,1 мкМ + 3 @ 0,1 мкМ	AVG	98,97	22,27	-19,34
	SD	0,28	34,18	11,80
15 @ 0,1 мкМ + 8 @ 0,1 мкМ	AVG	99,30	29,58	-3,32
	SD	0,15	27,38	11,27
15 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	99,33	19,51	-1,30
	SD	0,11	48,40	6,76
Соединение @ концентрация	% подавл.	10 @ 1 мкМ	10 @ 0,1 мкМ	10 @ 0,01 мкМ
15 @ 0,1 мкМ + 3 @ 0,1 мкМ	AVG	24,40	-6,35	-0,77
	SD	5,84	5,66	18,61
15 @ 0,1 мкМ + 8 @ 0,1 мкМ	AVG	16,26	2,31	-6,21
	SD	2,14	1,28	4,86
15 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	-0,86	0,98	-2,40
	SD	6,50	5,87	1,06
Соединение @ концентрация	% подавл.	9 @ 1 мкМ	9 @ 0,1 мкМ	9 @ 0,01 мкМ
18 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	72,55	66,59	64,76
	SD	0,22	11,12	8,34
15 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	82,81	86,91	78,60
	SD	1,05	1,41	13,08

Из таблицы 5 можно видеть, что для фармацевтических комбинаций «три-в-одном» показан значительный подавляющий эффект на жизнеспособность клеток опухоли. Из них, для фармацевтической комбинации соединения 3 плюс соединение 14 плюс соединение 12 и фармацевтической комбинации соединения 3 плюс соединение 8 плюс соединение 12 все еще показывали сильный эффект подавления жизнеспособности вплоть до 95% клеток опухоли, даже когда концентрация ингибитора ВТК являлась настолько низкой, как 10 нМ.

Таблица 6. Подавление индивидуальным соединением и композицией «три в одном» устойчивой линии клеток WSU-DLCL2 (% подавл.)

Соединение @ концентрация	% подавл.	1 мкМ	0.1 мкМ	0.01 мкМ
3	AVG	41,04	-1,36	-10,06
	SD	7,73	2,59	11,14
15	AVG	46,61	-8,32	-14,53
	SD	1,15	4,49	13,72
14	AVG	55,35	46,71	40,81
	SD	1,67	0,53	2,67
Соединение @ концентрация	% подавл.	3	3	3
15 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	83,76	63,69	56,67
	SD	1,33	4,19	4,36

Из таблицы 6 можно видеть, что для фармацевтической комбинации «три-в-одном» соединения 3 плюс соединение 15 плюс соединение 14 показан отличный эффект подавления жизнеспособности клеток с множественной лекарственной устойчивостью WSU-DLCL2, и она являлась значительно лучшей, чем каждое однонаправленное лекарственное средство.

Таблица 7. Подавление индивидуальным соединением и композицией «три в одном» линии клеток DoHH-2 (% подавл.)

Соединение @ концентрация	% подавл.	1 мкМ	0,1 мкМ	0,01 мкМ
3	AVG	49,93	34,83	15,58
	SD	2,72	0,70	5,54
15	AVG	51,32	6,75	-7,95
	SD	3,86	8,77	1,57
14	AVG	60,33	59,17	51,80
	SD	3,52	1,68	3,35
Соединение @ концентрация	% подавл.	3	3	3
15 @ 0,1 мкМ + 14 @ 0,1 мкМ	AVG	78,75	81,87	71,87
	SD	0,45	1,02	6,47

Из таблицы 7 можно видеть, что для фармацевтической композиции «три-в-одном» соединения 3 плюс соединение 15 плюс соединение 14 показан отличный эффект подавления жизнеспособности устойчивых клеток DoHH-2, и она являлась значительно лучшей, чем каждое однонаправленное лекарственное средство.

Таблица 8. Подавление композициями с различными соотношениями линии клеток TMD-8 (% подавл.)

Соотношение	% подавл.	1,0 мкМ	0,1 мкМ	0,01 мкМ
-------------	-----------	---------	---------	----------

соединений, соединение @ концентрация				
3+14 (молярное соотношение 19:1)	AVG	72,97	71,71	66,64
	SD	0,93	1,49	0,83
3+14+15 (молярное соотношение 19:1:37)	AVG	97,08	89,29	67,75
	SD	0,52	1,30	1,12
3+14+15 (молярное соотношение 1:1:1)	AVG	97,16	91,23	80,09
	SD	0,17	0,85	0,96
3+14+15 (молярное соотношение 50:1:1)	AVG	78,21	72,73	63,34
	SD	2,26	1,21	0,97
3+14+15 (молярное соотношение 10:1:1)	AVG	88,09	77,18	68,76
	SD	0,70	1,66	2,12
14 @ 0,1 мкМ + 15 @ 0,1 мкМ		3 @ 1 мкМ	3 @ 0,1 мкМ	3 @ 0,01 мкМ
	AVG	85,33	88,83	87,78
	SD	0,78	0,71	2,36

Из таблицы 8 можно видеть, что для фармацевтических комбинаций «три-в-одном» в различных соотношениях показан значительный эффект подавления жизнеспособности клеток TMD-8.

Таблица 9. PK параметры соединения 3 у крыс

Группа	1		2	
Способ дозирования	IV		PO	
Уровень дозы	2 мг/кг		10 мг/кг	
	AVG	SD	AVG	SD
C_0 or C_{\max} (нг/мл)	1390	247	641	191
T_{\max} (час)	-	-	1,33	0,753
$T_{1/2}$ (час)	0,787	0,0895	1,71	0,489
V_{dss} (л/кг)	1,61	0,339	-	-
CL (мл/мин/кг)	20,2	5,60	-	-
$AUC_{0-посл.}$ (час*нг/мл)	1740	421	3230	1120
$AUC_{0-инф.}$ (час*нг/мл)	1740	420	3260	1140
Биодоступность (%) ^a	-	-	37,1	-

Таблица 10. PK параметры соединения 3 у крыс

Группа	1		2	
Способ дозирования	IV		PO	
Уровень дозы	2 мг/кг		5 мг/кг	
	AVG	SD	AVG	SD
C_0 or C_{\max} (нг/мл)	663	79,5	189	53,3
T_{\max} (час)	-	-	1,17	0,408
$T_{1/2}$ (час)	2,27	0,873	2,92	1,22
V_{dss} (л/кг)	4,24	0,370	-	-
CL (мл/мин/кг)	34,6	5,58	-	-
$AUC_{0-посл.}$ (час*нг/мл)	977	181	650	247
$AUC_{0-инф.}$ (час*нг/мл)	987	183	574	123
Биодоступность (%) ^a	-	-	26,2	-

Таблица 11. TK параметры соединения 3 у крыс

Уровень дозы (мг/кг)	Сутки	Пол	C_{\max} (нг/мл)	T_{\max} (час)	$AUC_{0-24ч}$ (час*нг/мл)
-------------------------	-------	-----	-----------------------	------------------	------------------------------

40	1	Самец	2160	2,0	13700
		Самка	2660	1,0	17300
	28	Самец	2090	2,0	15400
		Самка	2970	1,0	17300
100	1	Самец	2740	2,0	21700
		Самка	3700	4,0	28900
	28	Самец	3990	2,0	30300
		Самка	3830	1,0	29600
200	1	Самец	4220	2,0	37600
		Самка	4680	4,0	65200
	28	Самец	4540	2,0	45100
		Самка	5490	8,0	60200

Таблица 12. ТК параметры соединения 3 у собак

Уровень дозы (мг/кг)	Сутки	Пол	Смакс (нг/мл)	Тмакс (час)	AUC _{0-24час} (час*нг/мл)
15	1	Самец	746 ± 18,1	2,0 (1,0-2,0)	3550 ± 562
		Самка	685 ± 212	1,0 (1,0-2,0)	2930 ± 980
	28	Самец	576 ± 145	2,0 (2,0-2,0)	3260 ± 732
		Самка	687 ± 123	2,0 (1,0-2,0)	3730 ± 549
45	1	Самец	1240 ± 381	2,0 (1,0-2,0)	6480 ± 1670
		Самка	1220 ± 431	2,0 (2,0-2,0)	6220 ± 3000
	28	Самец	1470 ± 538	2,0 (2,0-4,0)	9170 ± 3810
		Самка	1060 ± 263	2,0 (2,0-4,0)	8130 ± 1490
105	28	Самец	2700 ± 769	2,0 (2,0-2,0)	16400 ± 5410
		Самка	2420 ± 670	2,0 (2,0-4,0)	17300 ± 2830
150	1	Самец	2460 ± 858	4,0 (1,0-8,0)	22900 ± 13900
		Самка	1850 ± 605	2,0 (1,0-4,0)	11200 ± 5990

Таблица 13: Подавляющий эффект введения индивидуального лекарственного средства и фармацевтических комбинаций на клетки опухолей в моделях опухолей на животных

Фигуры	Курс лечения	Соединение (мг/кг)	Подавление опухоли (%)
Фигура 1	Введение через зонд, дважды в сутки, 14 суток	Контрольная группа	-
		1 (10 мг/кг)	56
		1 (30 мг/кг)	77
		3 (10 мг/кг)	64
		3 (30 мг/кг)	82
		3 (90 мг/кг)	93
Фигура 2	Введение через зонд, дважды в сутки, 14 суток	Контрольная группа	-
		3 (10 мг/кг)	63
		3 (30 мг/кг)	89
		15 (30 мг/кг)	24
		3 (10 мг/кг)	95
		15 (30 мг/кг)	-
Фигура 3	Введение через зонд, дважды в	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	90
		3 (10 мг/кг)	96
		15 (10 мг/кг)	-8

	сутки, 21 сутки	8 (10 мг/кг)	26
		3 (5 мг/кг)	82
		15 (10 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	89
		15 (10 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	95
		8 (10 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	98
		8 (10 мг/кг)	
		3 (5 мг/кг)	94
15 (10 мг/кг)			
8 (5 мг/кг)			
3 (10 мг/кг)	94		
15 (10 мг/кг)			
8 (10 мг/кг)			
15 (10 мг/кг)	86		
8 (10 мг/кг)			
Фигура 4	Введение через зонд, дважды в сутки, 21 сутки	Контрольная группа	-
		3 (10 мг/кг)	77
		16 (10 мг/кг)	16
		16 (30 мг/кг)	42
		14 (1 мг/кг)	97 (рост опухоли в результате отмены на сутки 17)
		14 (3 мг/кг)	99 (рост опухоли в результате отмены на сутки 19)
		3 (10 мг/кг)	100 (отсутствие роста опухоли в результате отмены на сутки 15)
		14 (1 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	100 (отсутствие роста опухоли в результате отмены
		14 (3 мг/кг)	результате отмены

			на сутки 15)
		3 (10 мг/кг)	72
		16 (10 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	80
		16 (30 мг/кг)	
Фигура 5	Введение через зонд, дважды в сутки, 21 суток	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	33
		3 (5 мг/кг)	100 (опухоль полностью исчезла на сутки 9,
		15 (5 мг/кг)	отсутствие роста в результате отмены)
		14 (0,5 мг/кг)	
Фигура 10	Введение через зонд, дважды в сутки, 14 суток	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	100 (опухоль полностью исчезла на сутки 10,
		15 (5 мг/кг)	отсутствие роста в результате отмены)
		14 (0,5 мг/кг)	
		3 (10 мг/кг)	100 (опухоль полностью исчезла на сутки 10,
		15 (1 мг/кг)	отсутствие роста в результате отмены)
		14 (0,5 мг/кг)	
		3 (20 мг/кг)	100 (опухоль полностью исчезла на сутки 10,
15 (1 мг/кг)	отсутствие роста в результате отмены)		
14 (0,5 мг/кг)			
Фигура 7	Введение через зонд, дважды в сутки, 21 сутки	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	15,9
		3 (5 мг/кг)	80,3
		15 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	
Фигура 6	Введение через зонд, дважды в сутки, 21 сутки	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	28,8
		3 (10 мг/кг)	20,1
		3 (30 мг/кг)	35,6
		3 (5 мг/кг)	58,3

		14 (0,5 мг/кг)	
		3 (5 мг/кг)	79,4
		15 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	
Фигура 8	Введение через зонд, дважды в сутки, 28 суток	Контрольная группа	-
		9 (30 мг/кг)	24
		3 (10 мг/кг)	22
		3 (30 мг/кг)	30
		3 (45 мг/кг)	32
Фигура 9	Введение через зонд, дважды в сутки, 18 суток	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	4
		3 (10 мг/кг)	7
		3 (30 мг/кг)	23
		3 (5 мг/кг)	44
		14 (0,5 мг/кг)	
		3 (5 мг/кг)	50
		15 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	
Фигура 11	Введение через зонд, дважды в сутки, 14 суток	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	63
		15 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	
		9 (4,3 мг/кг)	67
		15 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	
Фигура 12	Введение через зонд, дважды в сутки, 14 суток	Контрольная группа	-
		3 (5 мг/кг)	75
		12 (5 мг/кг)	12
		8 (10 мг/кг)	48
		3 (5 мг/кг)	86
		12 (5 мг/кг)	
		8 (10 мг/кг)	37
		12 (5 мг/кг)	
		12 (5 мг/кг)	77
		14 (0,5 мг/кг)	
		3 (5 мг/кг)	100
		12 (5 мг/кг)	
		14 (0,5 мг/кг)	

		3 (5 мг/кг)	89
		12 (5 мг/кг)	
		8 (10 мг/кг)	

Из таблицы 13 можно видеть, что введение лекарственного средства в комбинации оказывало синергический эффект и обеспечивало аддитивную летальность клеток опухолей. Терапевтический эффект введения в комбинации намного превышал эффект каждого однонаправленного лекарственного средства. Например, введение комбинации «два-в-одном» соединения 3 плюс соединение 14 могло приводить к полному исчезновению клеток опухолей за период лечения 15 суток. В то же время, введение комбинации «три-в-одном» соединения 3 плюс соединение 14 плюс соединение 15 могло приводить к полному исчезновению клеток опухолей за более короткий период лечения (9 суток), и роста опухоли в результате отмены не наблюдали через 12 суток после прекращения введения, что указывает на значительно лучший терапевтический эффект, чем у однонаправленных лекарственных средств.

Таблица 14. Влияние введения фармацевтических комбинаций на массу тела в моделях опухолей на животных

Масса животного (г)	Время (сутки)	0	2	5	7	9	12	14
		Контрольная группа	AVG	22,9	22,4	22,8	23,0	23,7
	SD	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
3 (5 мг/кг) 15 (5 мг/кг)	AVG	21,9	21,6	22,8	22,5	22,6	22,5	22,3
	SD	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,5	0,6
14 (0,5 мг/кг) 9 (4,3 мг/кг) 15 (5 мг/кг)	AVG	22,2	21,7	22,7	22,9	23,1	22,7	22,6
	SD	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,6
14 (0,5 мг/кг)	SD	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,6

Из таблицы 14 можно видеть, что для животных в различных группах не показано значительных различий массы тела, что указывает на то, что было безопасно вводить комбинации лекарственных средств при низких уровнях доз.

Таблица 15. Влияние введения фармацевтической комбинации 3/14/15 на массу тела в моделях опухолей на животных

Масса животного (г)	Время (сутки)	0	2	5	7	9	12	14
Контрольная группа	AVG	21,2	21,1	21,1	21,4	21,5	21,8	21,9
	SD	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
3 (5 мг/кг) 15 (5 мг/кг)	AVG	22,1	21,8	21,8	21,8	21,7	22,3	21,7
	SD	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7
3 (10 мг/кг) 15 (1 мг/кг) 14 (0,5 мг/кг)	AVG	21,6	21,5	21,8	22,2	22,4	22,4	22,1
	SD	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7
3 (20 мг/кг) 15 (1 мг/кг) 14 (0,5 мг/кг)	AVG	21,4	21,0	21,1	21,3	21,4	21,3	21,4
	SD	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6

Из таблицы 15 можно видеть, что для животных в различных группах не показано значительных различий массы тела, что указывает на то, что было безопасно вводить комбинации лекарственных средств при низких уровнях доз.

Таблица 16. Объем лапы - Артрит, индуцированный адьювантом

Объем лапы (мл)	Время (сутки)	0	17	26	28	31	33
Нормальная группа	AVG	1,00	1,08	1,05	1,05	1,05	1,04
	SD	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
Контроль с растворителем	AVG	1,12	2,18	2,71	2,71	2,69	2,70
	SD	0,09	0,09	0,15	0,11	0,11	0,11
3 (5 мг/кг) 14 (0,5 мг/кг)	AVG	1,03	1,77*	1,65***	1,69***	1,63***	1,53***
	SD	0,02	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07
3 (15 мг/кг) 14 (1,5 мг/кг)	AVG	1,01	1,62***	1,45***	1,44***	1,34***	1,29***
	SD	0,02	0,10	0,11	0,10	0,09	0,08
3 (30 мг/кг) 14 (3 мг/кг)	AVG	1,01	1,63***	1,50***	1,45***	1,41***	1,38***
	SD	0,01	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07
3 (5 мг/кг)	AVG	1,04	1,87ns	2,29**	2,12***	2,12***	2,09***
	SD	0,01	0,12	0,14	0,19	0,19	0,20
14 (0,5 мг/кг)	AVG	1,02	1,84ns	2,01***	2,04***	1,94***	1,93***
	SD	0,01	0,08	0,13	0,12	0,11	0,10
11 (3 мг/кг)	AVG	1,00	1,54***	1,37***	1,33***	1,23***	1,23***
	SD	0,02	0,08	0,08	0,07	0,05	0,05

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Из таблицы 16 можно видеть, что фармацевтическая комбинация «два-в-одном» являлась более эффективной, чем индивидуальные лекарственные средства.

Таблица 17. Патологический индекс - Артрит, индуцированный адьювантом

Группы	Патологический индекс (AVG \pm SD)				
	Инфильтрация воспалительных клеток	Образование паннуса	Повреждение хряща	Резорбция кости	Общий индекс
Нормальная группа	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00
Контроль с растворителем	4 \pm 0,00	4 \pm 0,00	3,8 \pm 0,13	3,7 \pm 0,15	15,5 \pm 0,27
3 (5 мг/кг) 14 (0,5 мг/кг)	3,5 \pm 0,22	2,8 \pm 0,25	2,6 \pm 0,27	2,8 \pm 0,29	11,7 \pm 0,96
3 (5 мг/кг) 14 (1,5 мг/кг)	2,9 \pm 0,31	1,6 \pm 0,22	1,1 \pm 0,28	2,2 \pm 0,49	7,8 \pm 1,21***
3 (30 мг/кг) 14 (3 мг/кг)	2,6 \pm 0,37	2,2 \pm 0,44	1,7 \pm 0,40	2,4 \pm 0,40	8,9 \pm 1,55***
3 (5 мг/кг) 14 (0,5 мг/кг)	3,5 \pm 0,34	3,2 \pm 0,53	2,8 \pm 0,51	3,0 \pm 0,45	12,5 \pm 1,78
14 (0,5 мг/кг) 11 (3 мг/кг)	3,9 \pm 0,10	3,7 \pm 0,21	3,5 \pm 0,27	3,5 \pm 0,17	146 \pm 0,54
11 (3 мг/кг)	1,9 \pm 0,18	0,4 \pm 0,22	0,2 \pm 0,20	0,5 \pm 0,22	3,0 \pm 0,73***

***p<0,001, по сравнению с пустым контролем, критерий Крускала-Уоллиса, апостериорный критерий Данна

Из таблицы 17 можно видеть, что фармацевтическая комбинация «два-в-одном» являлась более эффективной, чем индивидуальные лекарственные средства.

Table 18. Средний показатель клинической оценки на сутки 21 после начальной иммунизации - Артрит, индуцированный коллагеном

Клинический показатель	Время (сутки)	21	32	39	42
Нормальная группа	AVG	0,00	0,00	0,00	0,00
	AD	0,00	0,00	0,00	0,00
Пустой контроль	AVG	0,00	4,00	7,6	8,00
	AD	0,00	0,86	1,14	1,20
Дексаметазон (0,2 мг/кг)	AVG	0,00	0,60***	0,40***	0,20***
	AD	0,00	0,34	0,22	0,20
3 (1,5 мг/кг) 14 (0,15 мг/кг), дважды в сутки	AVG	0,00	1,60*	1,40***	1,60***
	AD	0,00	0,45	0,37	0,40
3 (4,5 мг/кг) 14 (0,45 мг/кг), дважды в сутки	AVG	0,00	0,40***	0,2***	0,10***
	AD	0,00	0,16	0,13	0,10
3 (1,5 мг/кг) 14 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	AVG	0,00	1,50***	1,40***	1,60***
	AD	0,00	0,40	0,50	0,58

3 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	AVG	0,00	2,60	4,20***	4,00***
	AD	0,00	0,86	1,14	1,22
14 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	AVG	0,00	1,00	5,60	5,70*
	AD	0,00	0,54	0,82	0,80
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, по сравнению с пустым контролем, двухфакторный ANOVA, апостериорный критерий Бонферрони					

Из таблицы 18 можно видеть, что фармацевтические комбинации «два-в-одном» являются более эффективными, чем индивидуальные лекарственные средства.

Таблица 19. Патологический индекс - Артрит, индуцированный коллагеном

Группы	Анализируемая часть тела	Патологический индекс (среднее ± SEM)				
		Инфильтрация воспалительных клеток	Образование паннуса	Повреждение хряща	Резорбция кости	Общий индекс
Пустой контроль	Левые задние лапы	1,60±0,65	1,30±0,56	1,40±0,58	1,00±0,42	15,50±2,30
	Правые задние лапы	2,80±0,61	2,40±0,54	2,50±0,56	2,50±0,56	
Дексаметазон (0,2 мг/кг), один раз в сутки	Левые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00 * **
	Правые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	
3 (1,5 мг/кг)	Левые задние лапы	0,50±0,22	0,20±0,20	0,20±0,20	0,10±0,10	1,50±0,78 * **
14 (0,15 мг/кг), дважды в сутки	Правые задние лапы	0,20±0,20	0,10±0,10	0,10±0,10	0,10±0,10	0,00±0,00 * **
3 (4,5 мг/кг)	Левые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	
14 (0,45 мг/кг), дважды в сутки	Правые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,80±0,80 *
3 (1,5 мг/кг)	Левые задние лапы	0,20±0,20	0,20±0,20	0,20±0,20	0,20±0,20	

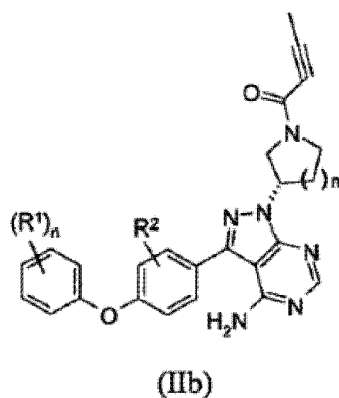
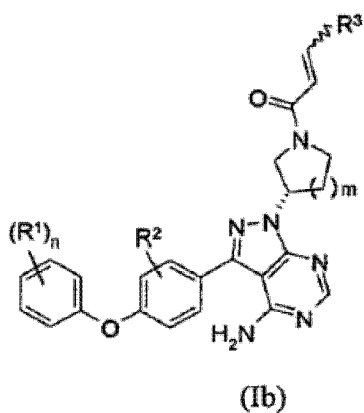
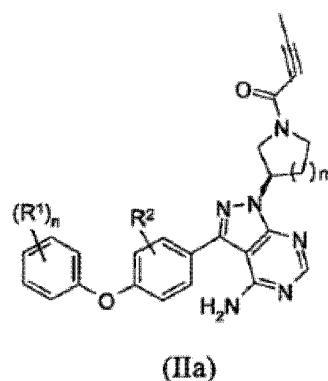
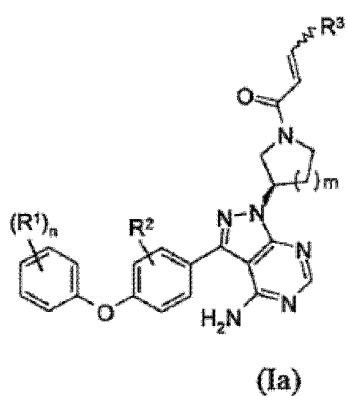
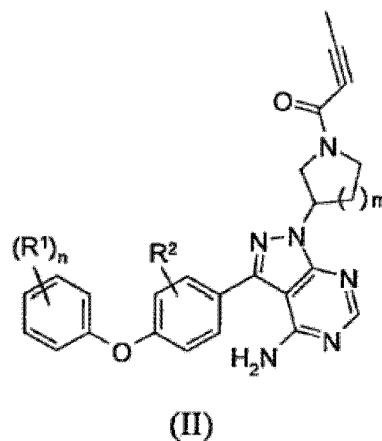
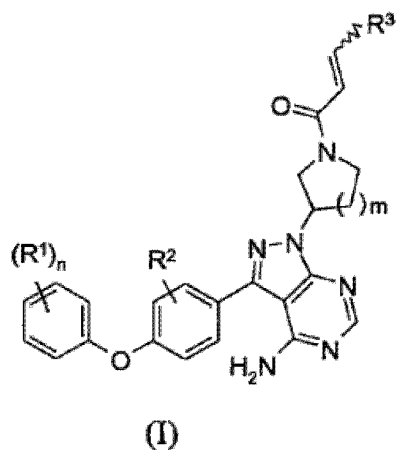
						**
14 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	Правые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	
3 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	Левые задние лапы	1,00±0,47	0,80±0,47	0,80±0,47	0,60±0,13	3,90±1,80 * **
	Правые задние лапы	0,20±0,20	0,20±0,20	0,20±0,20	0,10±0,10	
14 (0,15 мг/кг), один раз в сутки	Левые задние лапы	2,10±0,64	2,00±0,67	2,00±0,67	1,80±0,61	15,90±4,50
	Правые задние лапы	2,00±0,67	2,00±0,67	2,00±0,67	2,00±0,67	
Нормальная группа	Левые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00* **
	Правые задние лапы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	
***p<0,001, по сравнению с пустым контролем, критерий Крускала-Уоллиса, апостериорный критерий Данна						

Из таблицы 19 можно видеть, что фармацевтические комбинации «два-в-одном» являются более эффективными, чем индивидуальные лекарственные средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения лимфоидной злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества (а) ингибитора тирозинкиназы Брутона (ВТК), (b) ингибитора киназы-мишени рапамицина (mTOR) у млекопитающих и (c) ингибитора В-клеточной лимфомы 2 (Vcl-2).

2. Способ по п. 1, где ингибитор ВТК является соединением, представленным формулой (I), (II), (Ia), (Ib), (IIa) или (IIb)



где:

каждый R^1 представляет собой F;

R^2 представляет собой F;

R^3 представляет собой H или D;
n представляет собой 1, 2, 3 или 4; и
m представляет собой 1 или 2,
или его энантиомером, диастереомером или фармацевтически приемлемой солью.

3. Способ по п. 1, где ингибитор ВТК выбран из группы, состоящей из Соединения 1, Соединения 2, Соединения 3, Соединения 4, Соединения 5, Соединения 6, Соединения 7 и Соединения 7х, как показаны в таблице 1, или его энантиомером, диастереомером или фармацевтически приемлемой солью.

4. Способ по п. 1, где ингибитор ВТК представляет собой ибрутиниб или его фармацевтически приемлемую соль.

5. Способ по любому из п.п. 1-4, где ингибитор mTOR киназы представляет собой эверолимус или его фармацевтически приемлемую соль.

6. Способ по любому из п.п. 1-4, где ингибитор mTOR киназы представляет собой рапамицин или его фармацевтически приемлемую соль.

7. Способ по любому из п.п. 1-6, где ингибитор Vcl-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

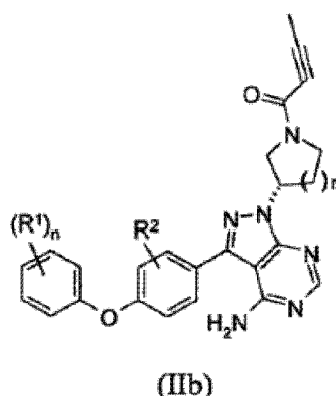
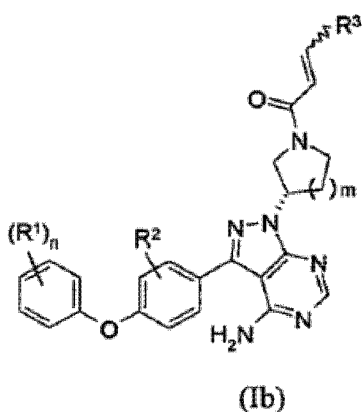
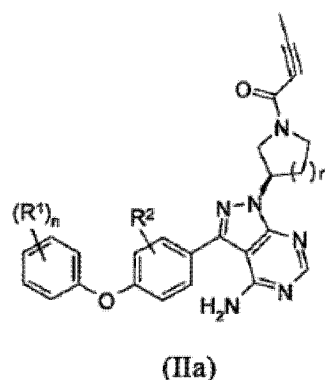
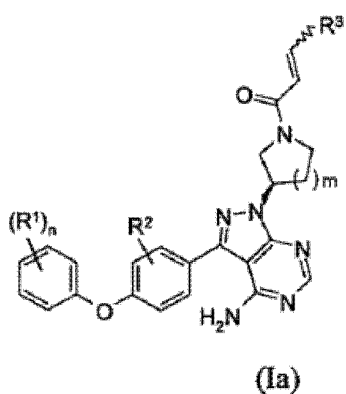
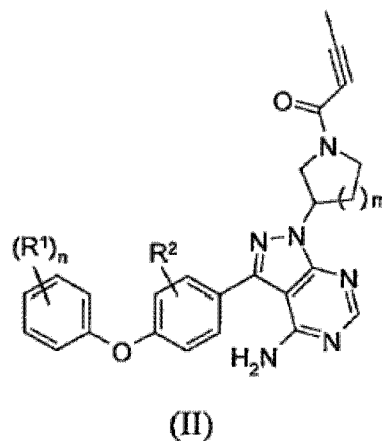
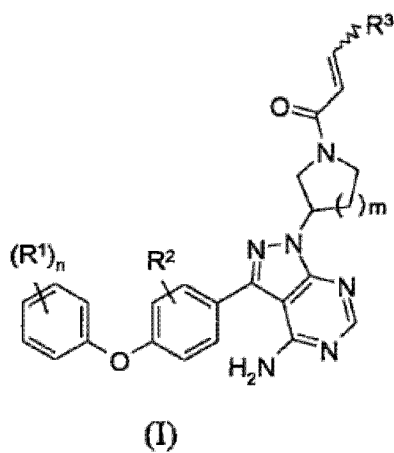
8. Способ по п. 1, где ингибитор ВТК представляет собой Соединение 3, как показано в Таблице 1, или его энантиомер, диастереомер или фармацевтически приемлемую соль; ингибитор mTOR киназы представляет собой эверолимус или его фармацевтически приемлемую соль; и ингибитор Vcl-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ по любому из предыдущих п.п., где лимфоидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), макроглобулинемии Вальденстрема (WM), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL) и множественной миеломы (MM).

10. Способ лечения иммунного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного

количества (а) ингибитора тирозинкиназы Брутона (ВТК) и (б) ингибитора киназы-мишени рапамицина (mTOR) у млекопитающих.

11. Способ по п. 10, где ингибитор ВТК является соединением, представленным формулой (I), (II), (Ia), (Ib), (IIa) или (IIb)



где:

каждый R^1 представляет собой F;

R^2 представляет собой F;

R^3 представляет собой H или D;

n представляет собой 1, 2, 3 или 4; и

m представляет собой 1 или 2,

или его энантиомером, диастереомером или фармацевтически приемлемой солью.

12. Способ по п. 11, где ингибитор ВТК выбран из группы, состоящей из Соединения 1, Соединения 2, Соединения 3, Соединения 4, Соединения 5, Соединения 6, Соединения 7 и Соединения 7х, как показаны в таблице 1, или его энантиомера, диастереомера или фармацевтически приемлемой соли.

13. Способ по п. 10, где ингибитор ВТК представляет собой ибрутиниб или его фармацевтически приемлемую соль.

14. Способ по любому из п.п. 10-13, где ингибитор mTOR киназы представляет собой эверолимус или его фармацевтически приемлемую соль.

15. Способ по любому из п.п. 10-13, где ингибитор mTOR киназы представляет собой рапамицин или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Способ по любому из п.п. 10-15, где способ предназначен для лечения аутоиммунного заболевания.

17. Способ по п. 16, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, псориаз, рассеянный склероз, язвенный колит, болезнь Крона или системную красную волчанку.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибитор киназы-мишени рапамицина (mTOR) у млекопитающих и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где композиция содержит

(i) ибрутиниб, Соединение 3 или Соединение 5, или его энантиомер, диастереомер или фармацевтически приемлемую соль; и

(ii) эверолимус или рапамицин, или его фармацевтически приемлемую соль.

20. Фармацевтическая композиция по п. 18 или 19, дополнительно содержащая иммуномодулирующее лекарственное средство IMiD.

21. Фармацевтическая композиция по п. 20, где IMiD представляет собой талидомид, леналидомид, помалидомид, СС-122 или СС-220.

22. Фармацевтическая композиция по п. 20, где композиция содержит

- (i) ибрутиниб, Соединение 3 или Соединение 5;
- (ii) эверолимус или рапамицин; и
- (iii) талидомид, леналидомид или помалидомид.

23. Фармацевтическая композиция по п. 18, дополнительно содержащая ингибитор Vcl-2.

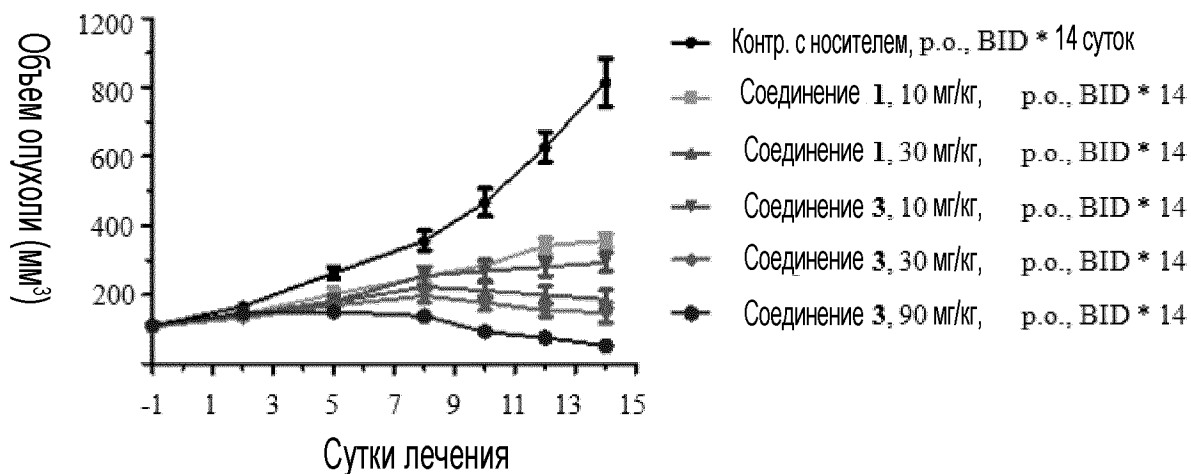
24. Фармацевтическая композиция по п. 23, где ингибитор Vcl-2 представляет собой венетоклакс или сабутоклакс.

25. Фармацевтическая композиция по п. 23, где композиция содержит

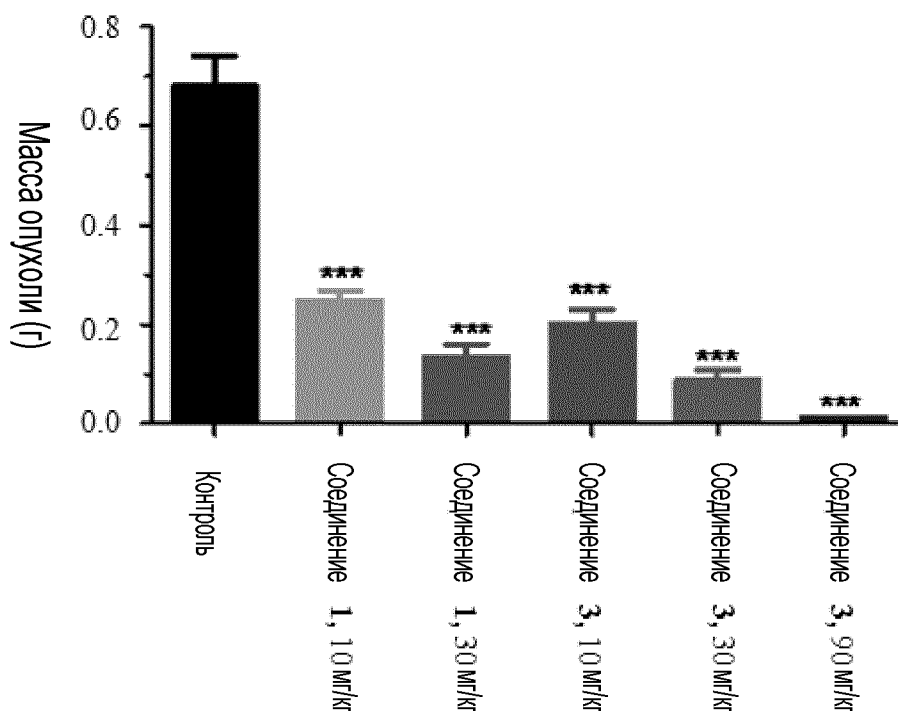
- (i) ибрутиниб, Соединение 3 или Соединение 5;
- (ii) эверолимус или рапамицин; и
- (iii) венетоклакс или сабутоклакс.

По доверенности

ФИГ. 1-А



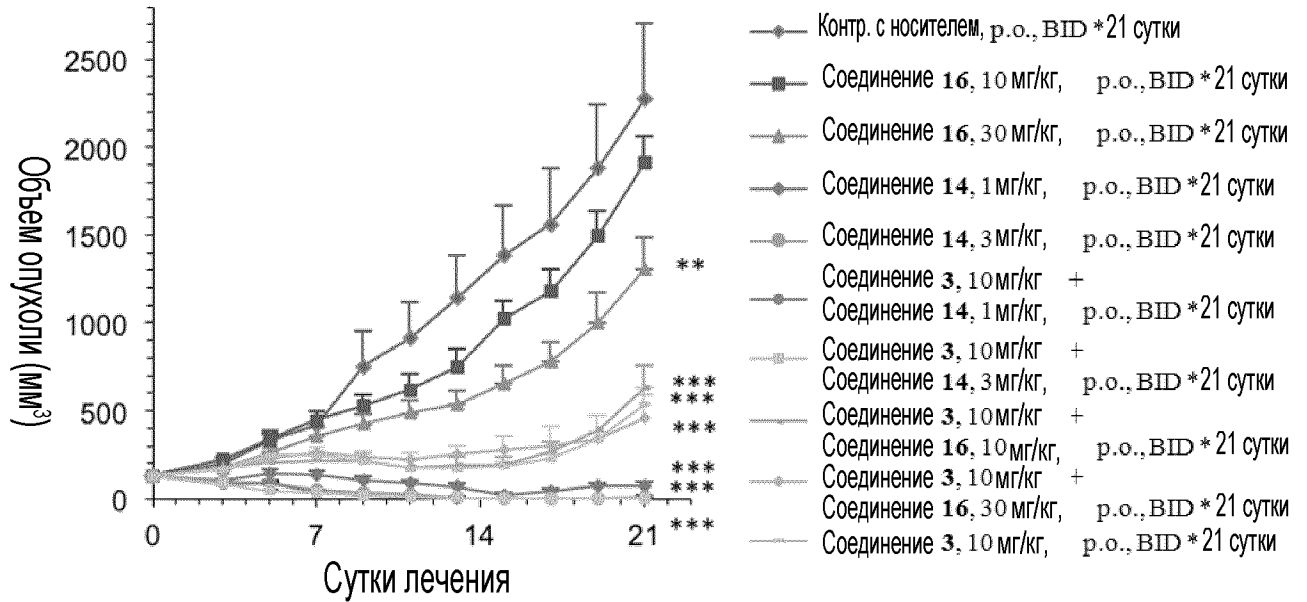
ФИГ. 1-В



Примечания: 1. Способ лечения: пероральное введение через зонд, два раза в сутки

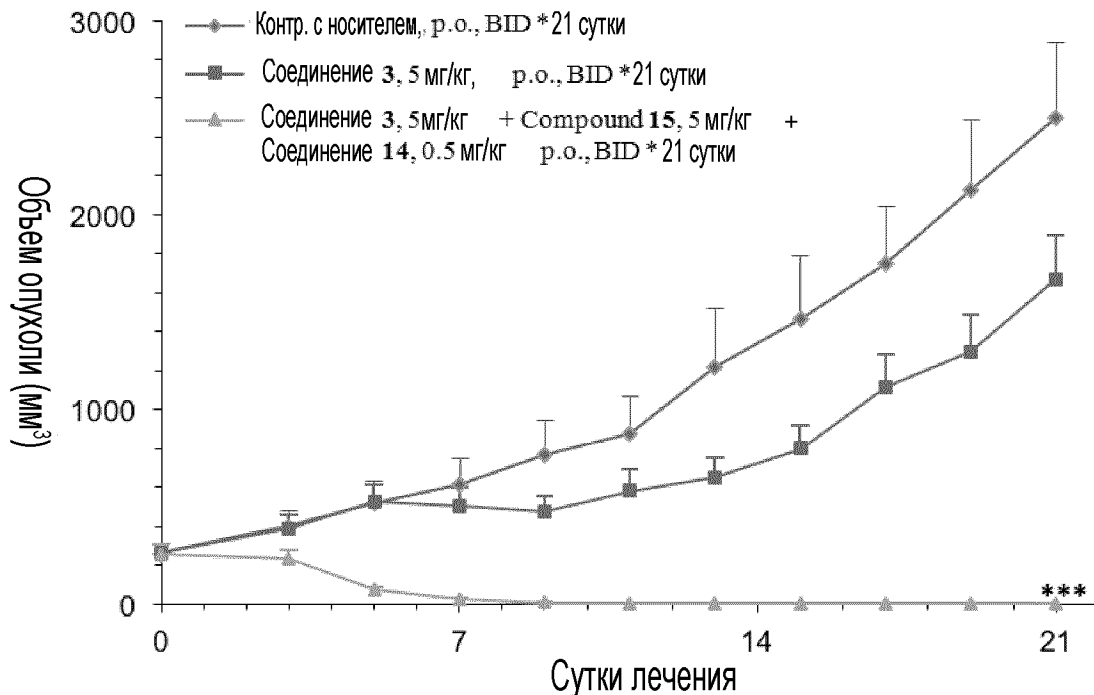
2. Сутки лечения *14 суток

ФИГ. 4



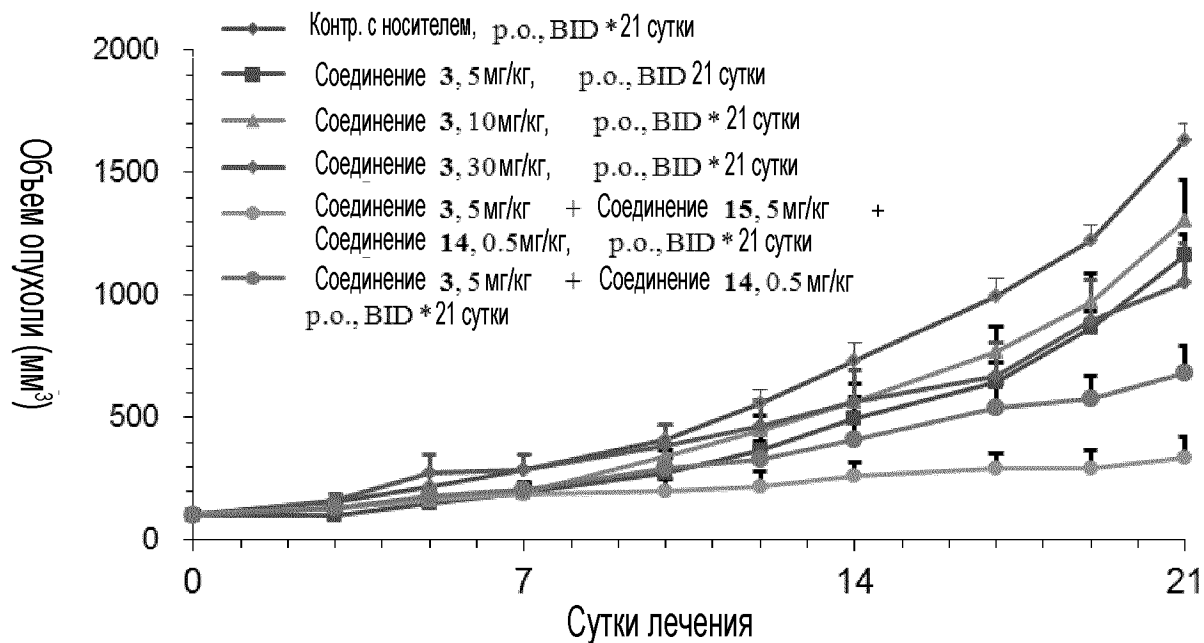
Примечание: 1. —●—, —●—, —●— и —■— Опухоль исчезала через 15 суток лечения;
 2. —●—, —●—, —●— и —■— Введение лекарственного средства прекращали через 15 суток;
 3. —●— и —●— Опухоль возникала в результате отмены после прекращения введения лекарственного средства

ФИГ. 5

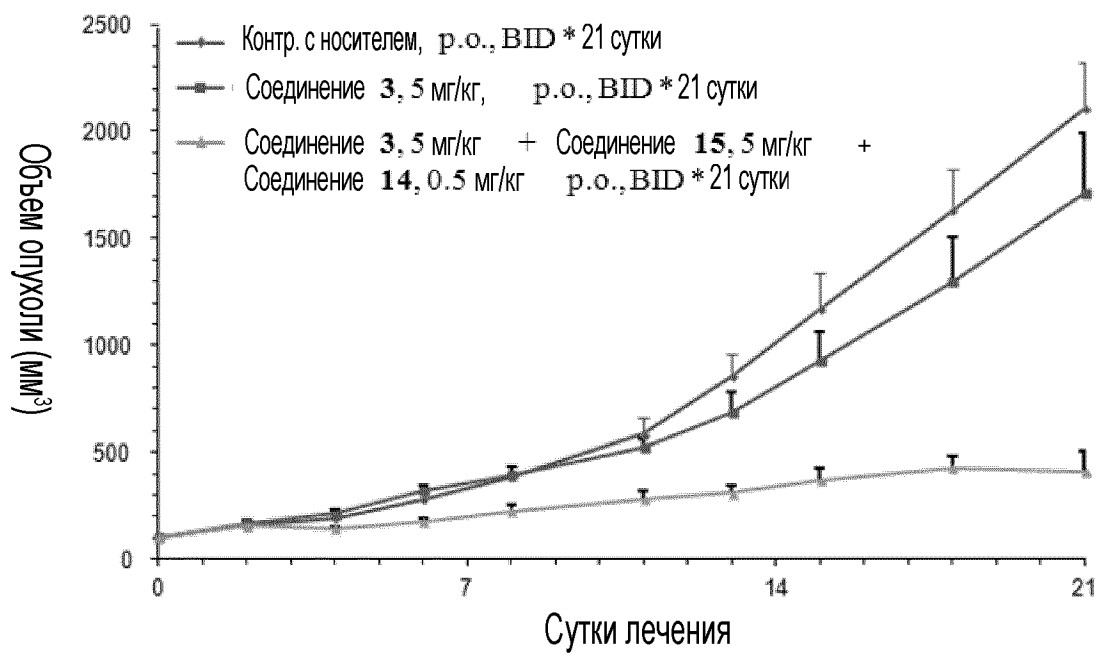


Примечание: 1. —▲— Опухоль исчезала через 9 суток лечения. Введение лекарственного средства прекращали.
 2. —▲— Не наблюдали возникновения опухоли в рез. отмены через 12 сут. после прекращ. введения лек. средства
 3. —■— Непрерывное введение лекарственного средства в течение 21 суток

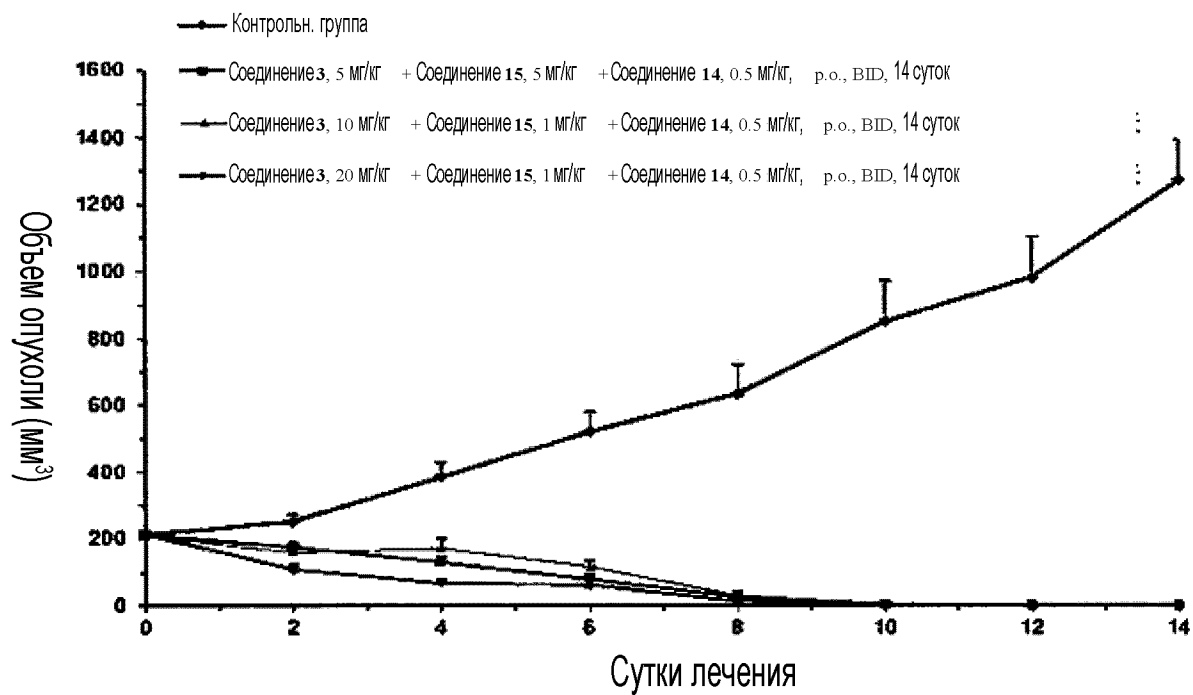
ФИГ. 6



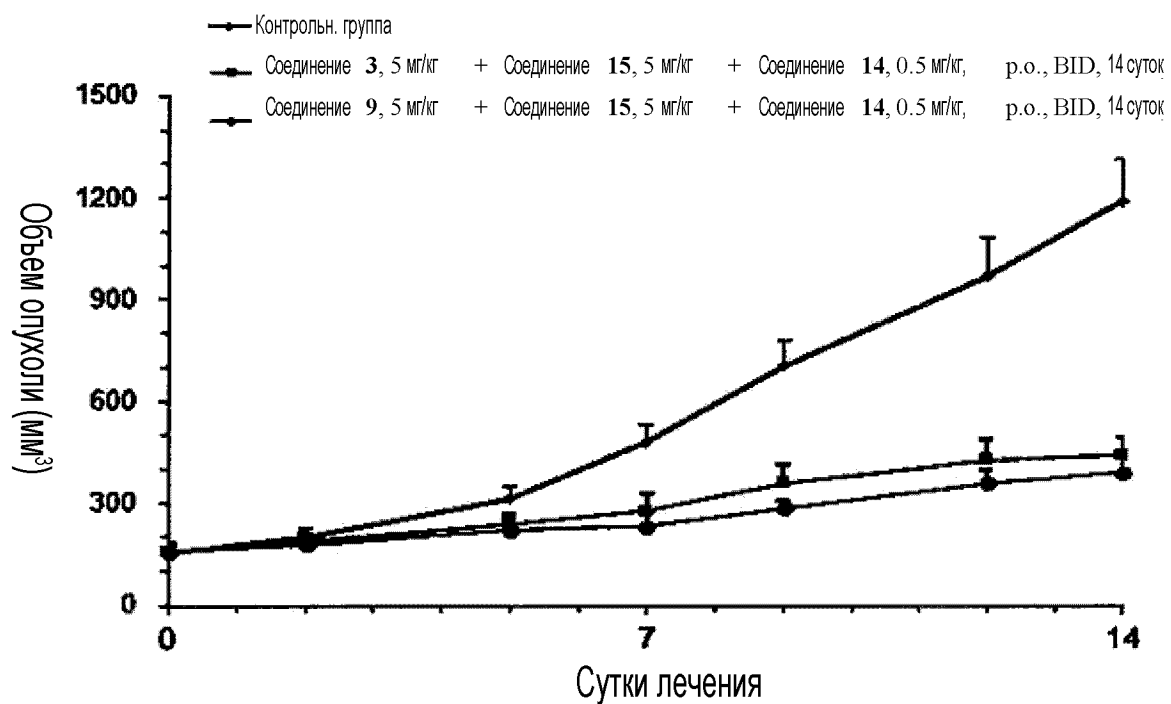
ФИГ. 7



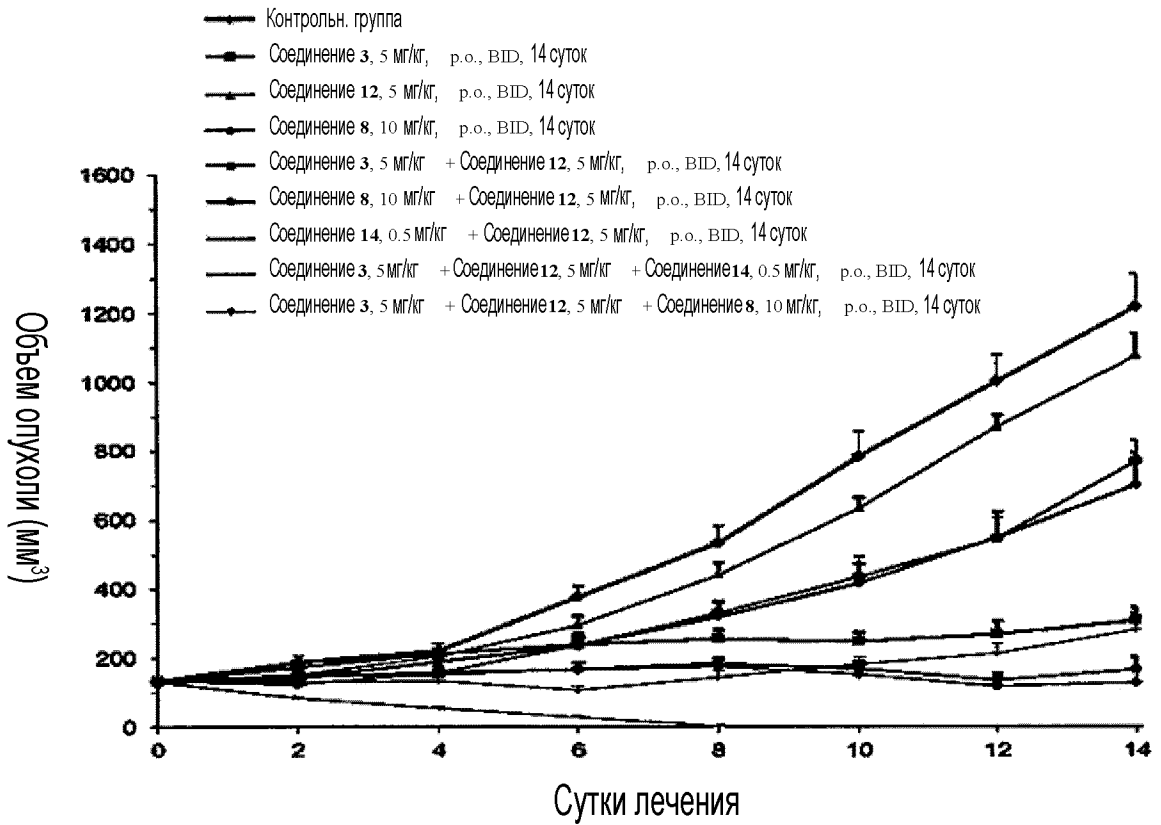
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14



Нормальная группа (50X)



Контрольная группа (50X)



Соединение 3, 5 мг/кг +
Соединение 14, 0.5 мг/кг,
p.o., BID, (50X)



Соединение 3, 15 мг/кг +
Соединение 14, 1.5 мг/кг,
p.o., BID, (50X)



Соединение 3, 30 мг/кг +
Соединение 14, 3 мг/кг,
p.o., QD, (50X)



Соединение 3, 5 мг/кг,
p.o., BID, (50X)



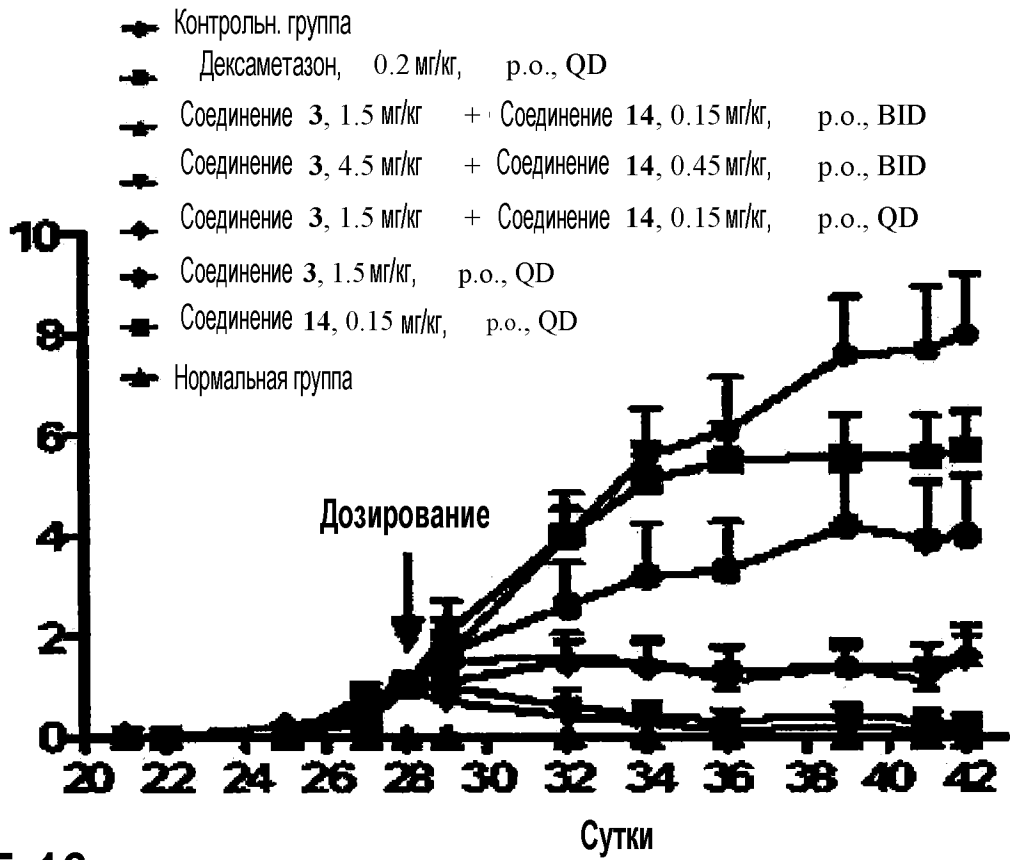
Соединение 14, 0.5 мг/кг,
p.o., BID, (50X)



Соединение 11, 3 мг/кг,
p.o., BID, (50X)

ФИГ. 15

Клинические показатели



ФИГ. 16

