

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291931** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.17

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ DGK И АНТАГОНИСТОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

(31) 62/950,570

(32) 2019.12.19

(33) US

(86) PCT/US2020/066198

(87) WO 2021/127554 2021.06.24

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Ви Сюзан, Бенси Джозеф Л., Ван
Синьи, Селапартхи Упендер, Чупак
Луис С., Дарне Четан П., Дин Минь,
Джентелс Роберт Г., Хуан Ячжун,
Мартин Скотт В., МакДональд
Ивар М., Олсон Ричард Е., Чжэн
Сяофань, Токраски Джон С., Дасгупта
Бирешвар (US), Кэмбл Манджунатха
Нарайяна Рао, Манноори Раджу,
Рахаман Хасибур, Джалагам Прасада
Рао, Рой Саумиа, Тонукунуру
Гопикашан, Велайах Сивасудар,
Варриер Джайякумар Санкара,
Редди Котха Ратхнакар, Раджа
Тхирувенкадам (IN), Груненефелдер
Денис, Вичроски Майкл Дж. (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) Предлагаются ингибиторы диацилглицеролкиназ (DGK) и способы лечения заболеваний, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, включающие введение ингибитора DGK в комбинации с антагонистом оси PD1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA4.

A1

202291931

202291931

A1

КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ DGK И АНТАГОНИСТОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/950570, поданной 19 декабря 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящий документе посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Рак человека характеризуется многочисленными генетическими и эпигенетическими изменениями, вызывающими образование неоантигенов, потенциально распознаваемых иммунной системой (Sjoblom et al. (2006) *Science* 314:268-74). Адаптивная иммунная система, состоящая из Т- и В-лимфоцитов, обладает мощным противораковым потенциалом, с широкой способностью и исключительной специфичностью реагировать на различные опухолевые антигены. Кроме того, иммунная система демонстрирует значительную пластичность и компонент памяти. Успешное использование всех этих свойств адаптивной иммунной системы сделало бы иммунотерапию уникальной среди всех методов лечения рака. Однако, хотя эндогенный иммунный ответ на рак наблюдался в доклинических моделях и у пациентов, этот ответ является неэффективным, и верифицированные злокачественные опухоли рассматривались как «самостоятельные», и допускались иммунной системой. Способствуя этому состоянию толерантности, опухоли могут использовать несколько различных механизмов для активного подрыва противоопухолевого иммунитета. Эти механизмы включают дисфункциональную передачу сигналов Т-клетками (Mizoguchi et al., (1992) *Science* 258:1795-98), подавляющие регуляторные клетки (Facciabene et al., (2012) *Cancer Res.* 72:2162-71), и кооптацию эндогенных «иммунных контрольных точек», которые служат для понижающего модулирования интенсивности адаптивных иммунных реакций и защиты нормальных тканей от сопутствующего повреждения, опухолями, чтобы избежать уничтожения иммунной системой (Topalian et al., (2012) *Curr. Opin. Immunol.* 24:1-6; Mellman et al. (2011) *Nature* 480:480-489).

Диацилглицеролкиназы (DGK) представляют собой липидкиназы, которые опосредуют превращение диацилглицерина в фосфатидную кислоту, тем самым прекращая функции Т-клеток, распространяющиеся через сигнальный путь TCR. Таким образом, DGK служат в качестве внутриклеточных контрольных точек, и ожидается, что ингибирование DGK усилит Т-клеточные сигнальные пути и активацию Т-клеток. Подтверждающие данные включают мышинные модели с нокаутом DGK α

или DGK ζ , которые демонстрируют гиперчувствительный фенотип Т-клеток и улучшенную противоопухолевую иммунную активность (Riese M.J. et al., *Journal of Biological Chemistry*, (2011) 7: 5254-5265; Zha Y et al., *Nature Immunology*, (2006) 12:1343; Olenchok B.A. et al., (2006) 11: 1174-81). Кроме того, наблюдалось, что инфильтрирующие опухоль лимфоциты, выделенные у пациентов с почечно-клеточной карциномой человека, сверхэкспрессируют DGK α , что приводит к ингибированию функции Т-клеток (Prinz, P.U. et al., *J Immunology* (2012) 12:5990-6000). Таким образом, DGK α и DGK ζ рассматриваются в качестве мишеней для иммунотерапии рака (Riese M.J. et al., *Front Cell Dev Biol.* (2016) 4: 108; Chen, S.S. et al., *Front Cell Dev Biol.* (2016) 4: 130; Avila-Flores, A. et al., *Immunology and Cell Biology* (2017) 95: 549-563; Noessner, E., *Front Cell Dev Biol.* (2017) 5: 16; Krishna, S., et al., *Front Immunology* (2013) 4:178; Jing, W. et al., *Cancer Research* (2017) 77: 5676-5686.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе предлагаются способы лечения заболевания или нарушения, включающие введение субъекту ингибитора DGK α , DGK ζ или обоих, DGK α и DGK ζ , такого как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, в комбинации с антагонистом оси PD1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA4. Типичные заболевания или нарушения включают те, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, такие как рак и инфекционные заболевания. Также предлагается применение ингибитора DGK α , DGK ζ или обоих, DGK α и DGK ζ , такого как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, и где ингибитор вводят в комбинации с антагонистом оси PD1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA4. В настоящем документе предлагается применение ингибитора DGK α , DGK ζ или обоих, DGK α и DGK ζ , такого как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и

инфекционные заболевания, и где ингибитор вводят в комбинации с антагонистом оси PD1/PD-L1 и антагонистом CTLA4.

Также обеспечено применение антагониста оси PD1/PD-L1 для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, и где антагонист вводят в комбинации с ингибитором $DGK\alpha$, $DGK\zeta$ или обоих, $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$, таким как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, и/или антагонистом CTLA4. Предлагается применение антагониста оси PD1/PD-L1 для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые получают благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, и где антагонист вводят в комбинации с ингибитором $DGK\alpha$, $DGK\zeta$ или обоих, $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$, таким как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, и антагонистом CTLA4.

Также, предлагается применение антагониста CTLA4 для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые получают благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, и где антагонист вводят в комбинации с ингибитором $DGK\alpha$, $DGK\zeta$ или обоих, $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$, таким как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, и/или антагонистом оси PD1/PD-L1. Предлагается применение антагониста CTLA4 для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений, таких как те, которые получают благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, таких как рак и инфекционные заболевания, и где антагонист вводят в комбинации с ингибитором $DGK\alpha$, $DGK\zeta$ или обоих, $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$, таким как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, или его фармацевтически приемлемая соль, и антагонистом оси PD1/PD-L1.

Типичные соединения, такие как соединения формулы I, описанные в настоящем документе, и их фармацевтически приемлемые соли, описаны в PCT/US2019/039131, поданной 26 июня 2019 г., и PCT/US2019/039135, поданной 26

июня 2019 г., содержание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения, такие как соединения формулы II, описанные в настоящем документе, и их фармацевтически приемлемые соли, описаны в документе PCT/US2020/048070, поданном 27 августа 2020 г., содержание которого специально включено в настоящий документ посредством ссылки.

Эти и другие признаки новых способов лечения будут изложены в развернутой форме по мере раскрытия.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фигурах 1 А и В показана усиленная секреция IFN- γ из Т-клеток, инкубированных с возрастающими концентрациями DGKi и ниволумаба (А) или ипилимумаба (В) в анализе MLR по сравнению с теми же анализами в отсутствие ниволумаба или ипилимумаба.

На фигурах 2 А-Н показано, что тройная комбинация DGKi с анти-PD-1 антителом и анти-CTLA4 антителом замедляет рост опухоли по сравнению с мышами, получавшими только анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело. На фигуре 2 А-Н показано изменение размера опухоли во времени после имплантации мышинных клеток меланомы B16 мышам, и получавших только носитель (фиг. 2А), только анти-PD-1 антитело (фиг. 2В), анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (фиг. 2С), DGKi и анти-PD-1 антитело (фиг. 2D), DGKi и анти-CTLA4 антитело (фиг. 2Е), только DGKi (фиг. 2F), DGKi и анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (фиг. 2G). На фиг. 2H показан средний размер опухоли после имплантации клеток B16 у мышей, получавших (i) анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело, (ii) DGKi и анти-PD1 антитело, (iii) DGKi и антитела к CTLA4, и (iv) DGKi и анти-PD1 антитела и анти-CTLA4 антитела.

На фигурах 3 А-І показано, что комбинированное лечение ингибитором DGK и анти-PD-1 антителом и/или анти-CTLA4 антителом приводит к улучшенным полным ответам (фиг. 3А), и что повышенный уровень ответа коррелирует с увеличением AN1+ CD8 Т-клеток (фиг. 3В) в мышинной модели CT26.

На фигурах 4А-F показано, что ингибирование DGK понижает пороговую концентрацию антигенов, необходимую для активации TCR. На фиг. 4А-F показаны уровни IL-2, секретируемого CD8 Т-клетками OT1, инкубированными с возрастающими уровнями антигена и представляющими один из пептидов OVA (А), A2 (В), Q4 (С), T4 (D) и Q4H7 (Е), что демонстрирует, что ингибирование DGK будет понижать концентрацию опухолевого антигена, необходимую для активации Т-клеток. На фиг. 4F показан уровень секретируемого IL-2 при 1000 нг/мл каждого из пептидов,

показанных на фиг. 4А-Е, а также полученный с использованием скремблированного пептида, который показывает, что ингибирование DGK будет усиливать Т-клеточный ответ, индуцированный слабыми опухолевыми антигенами.

На фигурах 5А и В показано, что ингибирование DGK увеличивает эффекторную функцию цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) человека и усиливает уничтожение опухолевых клеток. На фиг. 5А показан уровень секреции IFN- γ Т-клетками, инкубированными с пептидом в присутствии возрастающих концентраций DGKi. На фиг. 5В показано увеличенное уничтожение опухолевых клеток на 3-й день после инкубации опухолевых клеток с увеличенной концентрацией когнатного пептида.

На фигурах 6А и В показано, что DGKi может преодолевать снижение уровней B2М для восстановления эффекторной функции Т-клеток. На фиг. 6А показан уровень β 2-микроглобулина в CRISPR KO B2М в клетках HCT116. На фиг. 6В показано, что DGKi повышает уровни IFN- γ .

На фигуре 7 показан объем опухоли в зависимости от количества дней после имплантации опухолевых клеток в животной модели CT26 у мышей, получавших соединение 16 DGKi и анти-PD-1 антитело, в присутствии или в отсутствие истощающего CD8 антитела, демонстрируя, что присутствие истощающего CD8 антитела снижает уменьшение размеров опухоли.

На фигуре 8 показан объем опухоли в зависимости от количества дней после имплантации опухолевых клеток в животной модели CT26 у мышей, получавших соединение 16 DGKi и анти-PD-1 антитело, в присутствии или в отсутствие истощающего CD4 антитела, демонстрируя, что присутствие истощающего CD4 антитела стимулирует уменьшение размеров опухоли.

На фигуре 9 показан объем опухоли в зависимости от количества дней после имплантации опухолевых клеток в животной модели CT26 у мышей, получавших соединение 16 DGKi и анти-PD-1 антитело, в присутствии или в отсутствие истощающего NK-клетки антитела, демонстрируя, что присутствие истощающего NK-клетки антитела снижает уменьшение размеров опухоли.

На фигуре 10 показано, что комбинация DGKi либо с анти-PD-1, либо с анти-CTLA4 способна вызывать полную регрессию опухоли (CR) в модели опухоли MC38. Объем опухоли для индивидуальных животных представлен после обработки только носителем (фиг. 10А), DGKi (фиг. 10В), анти-PD-1 (фиг. 10С), анти-CTLA4 (фиг. 10D), DGKi и анти-PD-1 (фиг. 10Е) или DGKi и анти-CTLA4 (фиг. 10F). Каждая из

монотерапий DGKi, анти-PD-1 и анти-CTLA4 способна задерживать рост опухоли. Комбинация DGKi и анти-PD-1 вызывает CR опухолей у 100% протестированных животных, тогда как комбинация DGKi и анти-CTLA4 вызывает CR у 70% подвергнутых тестированию мышей.

На фигуре 11 показано, что добавление DGKi к терапии анти-PD-1 может вызывать полную регрессию (CR) опухолей как в животных моделях MC38, так и CT26, и что у излечившихся животных из этих групп развивается иммунологическая память, достаточная для того, чтобы отторгнуть повторное заражение опухолью. Объем опухоли для индивидуальных животных представлен после обработки только носителем (фиг. 11A и 11E), анти-PD-1 (фиг. 11B и 11F) или анти-PD-1 и DGKi (фиг. 11C и 11G). DGKi вызывает сильный комбинированный эффект с анти-PD-1, что приводит к 100% и 60% CR опухолей в моделях MC38 и CT26, соответственно. Для оценки иммунологической памяти у излечившихся животных мышей повторно заражали 10-кратным количеством опухолевых клеток, использованных для первоначальной имплантации, и измеряли объем опухоли в зависимости от дней после имплантации. Все повторно зараженные животные в когорте MC38 (фиг. 11D) и когорте CT26 (фиг. 11H) спонтанно отторгли опухоли, подтверждая, что комбинированная терапия DGKi и анти-PD-1 вызывает долговременную иммунологическую память.

На фигуре 12 показано, что тройная терапия анти-PD-1, анти-CTLA4 и DGKi может уменьшить рост опухоли в модели опухоли B16F10, рефрактерной к ингибитору контрольных точек. Объем опухоли для отдельных животных представлен после обработки только носителем (фиг. 12A), анти-PD-1 и анти-CTLA4 (фиг. 12B), анти-PD-1 и DGKi (фиг. 12C), анти-CTLA4 и DGKi (фиг. 12D) или анти-PD-1, анти-CTLA4 и DGKi (фиг. 12E). Средние объемы опухолей для каждой группы представлены на фиг. 12F.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе предлагаются способы лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или вирусная инфекция, или, в более общем смысле, заболевания, нарушения или состояния, которое получает благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, а также любого заболевания, нарушения или состояния, которое может можно предупредить, ослабить или вылечить путем ингибирования ферментативной активности DGK α и/или DGK ζ , включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества

ингибитора DGK α и/или DGK ζ или его фармацевтически приемлемой соли и (i) антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и/или (ii) антагониста CTLA4 человека.

Определения

Признаки и преимущества способов лечения могут быть легче поняты специалистами в данной области после прочтения следующего подробного описания. Следует понимать, что некоторые признаки способов лечения, которые для ясности описаны выше и ниже в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть комбинированы с получением одного варианта осуществления. И наоборот, различные признаки способов лечения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть комбинированы с получением их подкомбинаций. Варианты осуществления, определенные в настоящем документе как иллюстративные или предпочтительные, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения.

Если здесь специально не указано иное, ссылки, сделанные в единственном числе, могут также включать множественное число. Например, «а» и «an» могут относиться либо к одному, либо к одному или нескольким.

Используемая в настоящем документе фраза «соединения и/или их фармацевтически приемлемые соли» относится по меньшей мере к одному соединению, по меньшей мере к одной соли соединений, или их комбинациям. Например, соединения формулы (I) и/или их фармацевтически приемлемые соли включают соединение формулы (I); два соединения формулы (I); фармацевтически приемлемую соль соединения формулы (I); соединение формулы (I) и одну или несколько фармацевтически приемлемых солей соединения формулы (I); и две или более фармацевтически приемлемых солей соединения формулы (I).

Если не указано иное, предполагается, что любой атом с ненасыщенными валентностями имеет атомы водорода, достаточные для насыщения валентностей.

Определения, изложенные в настоящем документе, имеют приоритет над определениями, изложенными в любом патенте, патентной заявке и/или публикации патентной заявки, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Ниже перечислены определения различных терминов, используемых в настоящем документе. Эти определения применяются к терминам в том виде, в каком

они используются в описании (если только последние не ограничены иным образом в конкретных случаях) либо по отдельности, либо как часть большей группы.

По всему описанию группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для получения стабильных фрагментов и соединений.

В соответствии с соглашением, используемым в данной области,  используется в структурных формулах в настоящем документе для обозначения связи, которая является точкой присоединения фрагмента или заместителя к структуре ядра или основной цепи.

Термины «галоген» и «галоген», используемые в настоящем документе, относятся к F, Cl, Br и I.

Термин «циано» относится к группе -CN.

Термин «амино» относится к группе -NH₂.

Термин «оксо» относится к группе =O.

Используемый в настоящем документе термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим углеводородным группам с разветвленной или прямой цепью, содержащим, например, от 1 до 12 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода и от 1 до 4 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, но без ограничения, метил (Me), этил (Et), пропил (*например*, н-пропил и изопропил), бутил (*например*, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил) и пентил (*например*, н-пентил, изопентил, неопентил), н-гексил, 2-метилпентил, 2-этилбутил, 3-метилпентил и 4-метилпентил. Когда числа появляются в нижнем индексе после символа «C», нижний индекс более точно определяет количество атомов углерода, которое может содержать конкретная группа. Например, «C₁₋₄ алкил» обозначает алкильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от одного до четырех атомов углерода.

Термин «фторалкил», используемый в настоящем документе, предназначен для включения насыщенных алифатических углеводородных групп с разветвленной и прямой цепью, замещенных одним или несколькими атомами фтора. Например, подразумевается, что «C₁₋₄ фторалкил» включает C₁, C₂, C₃ и C₄ алкильные группы, замещенные одним или несколькими атомами фтора. Репрезентативные примеры фторалкильных групп включают, но без ограничения, -CF₃ и -CH₂CF₃.

Термин «цианоалкил» включает насыщенные алкильные группы с разветвленной и прямой цепью, замещенные одной или несколькими цианогруппами. Например, «цианоалкил» включает -CH₂CN, -CH₂CH₂CN и C₁₋₄ цианоалкил.

Термин «аминоалкил» включает насыщенные алкильные группы с разветвленной и прямой цепью, замещенные одной или несколькими аминогруппами. Например, «аминоалкил» включает $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ и C_{1-4} аминоалкил.

Термин «гидроксиалкил» включает насыщенные алкильные группы с разветвленной и прямой цепью, замещенные одной или несколькими гидроксильными группами. Например, «гидроксиалкил» включает $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ и C_{1-4} гидроксиалкил.

Термин «алкенил» относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 12 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры таких групп включают этенил или аллил. Например, « C_{2-6} алкенил» обозначает алкенильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от двух до шести атомов углерода.

Термин «алкинил» относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 12 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры таких групп включают этинил. Например, « C_{2-6} алкинил» обозначает алкинильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от двух до шести атомов углерода.

Термин «циклоалкил», используемый в настоящем документе, относится к группе, полученной из неароматической моноциклической или полициклической углеводородной молекулы путем удаления одного атома водорода от атома углерода насыщенной кольцевой системы. Репрезентативные примеры циклоалкильных групп включают, но без ограничения, циклопропил, цикlopентил и циклогексил. Когда числа появляются в нижнем индексе после символа «C», нижний индекс более точно определяет количество атомов углерода, которое может содержать конкретная циклоалкильная группа. Например, « C_{3-6} циклоалкил» обозначает циклоалкильные группы с тремя-шестью атомами углерода.

Термин «алкокси», используемый в настоящем документе, относится к алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода, например, метоксигруппе ($-\text{OCH}_3$). Например, « C_{1-3} алкокси» обозначает алкоксигруппы с одним-тремя атомами углерода.

Термины «фторалкокси» и «-O(фторалкил)» представляют собой фторалкильную группу, как определено выше, присоединенную через кислородную

связь (-O-). Например, подразумевается, что «C₁₋₄ фторалкокси» включает C₁, C₂, C₃ и C₄ фторалкоксигруппы.

Термин «алкаленил» относится к насыщенной углеродной цепи с двумя точками присоединения к структуре ядра или основной цепи. Алкаленильная группа имеет структуру $-(CH_2)_n-$, в которой n представляет собой целое число, равное 1 или больше. Примеры алкаленильных связей включают $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ и $-(CH_2)_{2-4}-$.

Выражение «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без вызывания чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, или других проблем или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Соединение, например, соединения формулы (I), может образовывать фармацевтически приемлемые соли, которые можно использовать в описанных в настоящем документе способах. Если не указано иное, подразумевается, что ссылка на соединение включает ссылку на одну или несколько его фармацевтически приемлемых солей. Термин «соль(и)» обозначает кислые и/или основные фармацевтически приемлемые соли, образованные с неорганическими и/или органическими кислотами и основаниями. Кроме того, термин «соль(и)» может включать цвиттер-ионы (внутренние соли), *например*, когда соединение формулы (I) содержит как основной фрагмент, такой как аминное или пиридиновое или имидазольное кольцо, так и кислотный фрагмент, такой как карбоновая кислота. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые (*т.е.* нетоксичные, физиологически приемлемые) соли, такие как, например, приемлемые соли металлов и аминов, в которых катион не вносит заметного вклада в токсичность или биологическую активность соли. Однако, могут быть использованы и другие соли, *например*, на стадиях выделения или очистки, которые могут применяться в процессе получения и поэтому рассматриваются в настоящем документе. Соли соединений, например, соединения формулы (I), могут быть получены, например, путем взаимодействия соединения, например соединения формулы (I), с некоторым количеством кислоты или основания, таким как эквивалентное количество, в среде, такой как среда, в которой соль осаждается, или в водной среде с последующей лиофилизацией.

Примеры кислотно-аддитивных солей включают ацетаты (например, образованные присоединением уксусной кислоты или тригалогенуксусной кислоты, например, трифторуксусной кислоты), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, фумараты, глюкогоептаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образованные реакцией с хлористоводородной кислотой), гидробромиды (образованные реакцией с бромистым водородом), гидройодиды, малеаты (образованные с малеиновой кислотой), 2-гидроксиэтансульфонаты, лактаты, метансульфонаты (образованные с метансульфоновой кислотой), 2-нафталинсульфонаты, никотинаты, нитраты, оксалаты, пектинаты, персульфаты, 3-фенилпропионаты, фосфаты, пикраты, пивалаты, пропионаты, салицилаты, сукцинаты, сульфаты (например, образуемые реакцией с серной кислотой), сульфонаты (например, упомянутые в настоящем документе), тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты, такие как тозилаты, ундеканоаты и т.п.

Примеры основных солей включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия, лития и калия; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли бария, цинка и алюминия; соли с органическими основаниями (например, органическими аминами), такими как триалкиламины, такие как триэтиламин, прокаин, дибензиламин, N-бензил-β-фенетиламин, 1-эфенамин, N,N'-дибензилэтилендиамин, дегидроабиетиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, дициклогексиламин или аналогичные фармацевтически приемлемые амины, и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.п. Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы с помощью таких агентов, как низшие алкилгалогениды (например, метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, бромиды и йодиды), диалкилсульфаты (например, диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфаты), длинноцепочечные галогениды (например, децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и йодиды), аралкилгалогениды (например, бензил- и фенетилбромиды) и другие. Предпочтительные соли включают моногидрохлориды, гидросульфаты, метансульфонаты, фосфаты или нитраты.

Соединения, например, соединения формулы (I), могут быть представлены в виде аморфных твердых веществ или кристаллических твердых веществ. Лиофилизацию можно использовать для получения соединений, например, соединений формулы (I), в виде твердого вещества.

Кроме того, следует понимать, что сольваты (например, гидраты) соединений, например, соединений формулы (I), также могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе. Термин «сольват» означает физическую ассоциацию соединения, например, соединения формулы (I) с одной или несколькими молекулами растворителя, органического или неорганического. Эта физическая ассоциация включает связывание водорода. В некоторых случаях сольват может быть выделен, например, когда одна или несколько молекул растворителя встроены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. «Сольват» включает как сольваты в фазе раствора, так и выделяемые сольваты. Примеры сольватов включают гидраты, этаноляты, метаноляты, изопропанолаты, сольваты с ацетонитрилом и сольваты с этилацетатом. Способы сольватации известны в данной области техники.

Различные формы пролекарств хорошо известны в данной области и описаны в:

- a) *The Practice of Medicinal Chemistry*, Camille G. Wermuth et al., Ch 31, (Academic Press, 1996);
- b) *Design of Prodrugs*, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);
- c) *A Textbook of Drug Design and Development*, P. Krogsgaard-Larson and H. Bundgaard, eds. Ch 5, pgs 113 – 191 (Harwood Academic Publishers, 1991); и
- d) *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Bernard Testa and Joachim M. Mayer, (Wiley-VCH, 2003).

Кроме того, соединения, например, соединения формулы (I), после их получения могут быть выделены и очищены для получения композиции, содержащей некоторое количество по массе, равное или превышающее 99% соединения, например, соединения формулы (I) («практически чистое»), которое затем используют или составляют, как описано в настоящем документе. Такие «по существу чистые» соединения, например, соединения формулы (I), также рассматриваются в настоящем документе.

«Стабильное соединение» и «стабильная структура» предназначены для обозначения соединения, которое является достаточно устойчивым, чтобы сохраниться до пригодной степени чистоты при выделении из реакционной смеси и при составлении в эффективный терапевтический агент. Соединения для применения в настоящем документе предназначены для воплощения стабильных соединений.

Соединения, описанные в настоящем документе, предполагают включение всех изотопов атомов, встречающихся в рассматриваемых соединениях. Изотопы включают

те атомы, которые имеют одинаковое атомное число, но разные массовые числа. В качестве общего примера и без ограничения изотопы водорода включают дейтерий (D) и тритий (T). Изотопы углерода включают ^{13}C и ^{14}C . Как правило, соединения, меченные изотопами, могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным в настоящем документе, с использованием соответствующего реагента, меченного изотопом, вместо используемого в других случаях немеченого реагента.

«Лечение», как используется в настоящем документе, охватывает любое введение или нанесение терапевтического средства для лечения заболевания у человека и включает ингибирование прогрессирования заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания, замедление заболевания или его прогрессирования или одного или нескольких его симптомов, остановку его развития, частичное или полное облегчение заболевания или одного или нескольких его симптомов, или предупреждение повторного возникновения одного или нескольких симптомов заболевания.

Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения человека, если специально не указано иное.

Выражение «ингибиторы DGK α и/или DGK ζ » относится к «ингибиторам активности ферментов DGK α и/или DGK ζ », оба из которых относятся к ингибиторам DGK α человека и/или DGK ζ человека, такому как DGK α , имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, без аминокислот, которые в природе не присутствуют в DGK α (например, His-хвост или некоторые N-концевые аминокислоты), и DGK ζ , имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4, без аминокислот, которые в природе не присутствуют в DGK ζ (например, His-хвост или некоторые N-концевые аминокислоты).

Белок-мишень, используемый в настоящем документе, например, DGK, PD-1, PD-L1 и CTLA4, относится к белку-мишени человека, если специально не указано иное или в контексте явно не указано иное. Например, «мышинный DGK» относится к мышинной версии DGK, поскольку он конкретно это указывает.

«PD1» используется взаимозаменяемо с «PD-1».

«CTLA4» используется взаимозаменяемо с «CTLA-4».

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у субъекта, например, для частичного или полного облегчения одного или нескольких симптомов. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Термин «рак» используется в настоящем документе для обозначения группы клеток, которые демонстрируют аномально высокие уровни пролиферации и роста. Рак может быть доброкачественным (также называемым доброкачественной опухолью), предраковым или злокачественным. Раковые клетки могут представлять собой солидные раковые клетки или лейкозные раковые клетки. Примеры видов рака, применимых для способов лечения по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или рак матки, рак слюнных желез, рак почки, почечно-клеточную карциному, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичек, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак желудка, меланому и различные виды рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи).

Термин «рост опухоли» используется в настоящем документе для обозначения пролиферации или роста клетки или клеток, которые содержат рак, что приводит к соответствующему увеличению размера или распространенности рака.

Введение «в комбинации с» одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (параллельное) и последовательное (последующее) введение в любом порядке.

Способы лечения

В настоящем документе предлагаются способы лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или вирусная инфекция, или, в более общем смысле, заболевание, нарушение или состояние, которые будут получать благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, а также любого заболевания, нарушения или состояния, которое можно предупредить, облегчить или вылечить путем ингибирования активности фермента DGK α и/или DGK ζ , включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (i) ингибитора DGK α и/или DGK ζ и (ii) антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и/или антагонист CTLA4 человека. В настоящем документе предлагаются способы лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или вирусная инфекция, или, в более общем смысле, заболевания, нарушения или состояния, которое получает благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, а также любого заболевания, нарушения или состояния, которое можно предупредить, облегчить или вылечить путем ингибирования активности фермента DGK α и/или DGK ζ , включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (i) ингибитора DGK α и/или DGK ζ и (ii) антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека). В настоящем документе предлагаются способы лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или вирусная инфекция, или, в более общем смысле, заболевания, нарушения или состояния, которое получает благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, а также любого заболевания, нарушения или состояния, которое можно предупредить, облегчить или вылечить путем ингибирования активности ферментата DGK α и/или DGK ζ , включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (i) ингибитора DGK α и/или DGK ζ и антагониста CTLA4 человека. В некоторых вариантах осуществления лечение пролиферативного заболевания, такого как рак или вирусная инфекция, или, в более общем смысле, заболевания, нарушения или состояния, которое получает благоприятный эффект от стимуляции иммунной системы, а также любого заболевания, нарушения или состояния, которое можно предотвратить, облегчить или вылечить путем ингибирования активности фермента DGK α и/или DGK ζ , включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (i) ингибитора DGK α и/или DGK ζ и (ii) антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и антагониста CTLA4 человека.

Введение (i) ингибитора DGK α и/или DGK ζ и (ii) антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и/или антагониста CTLA4 человека может быть одновременным или последовательным. Например, в некоторых вариантах осуществления способ лечения рака или заболевания, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, сначала ингибитора DGK α и/или DGK ζ , а затем позже (например, через 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дня, 3 дня или более) введение антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и/или антагониста CTLA4 человека. Способ, например, способ лечения рака, может включать лечение рака или заболевания, которые можно лечить путем усиления иммунного ответа, и включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, сначала антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и/или антагониста CTLA4 человека, а затем, позже (например, через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня или более) введение ингибитора DGK α и/или DGK ζ . Способ, например, способ лечения рака, может включать введение сначала ингибитора DGK α и/или DGK ζ , а затем позже (например, через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня или более) введение антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и одновременно введение антагониста CTLA4 человека. Способ, например, способ лечения рака, может включать введение сначала ингибитора DGK α и/или DGK ζ , а затем позже (например, через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня или более) введение антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и одновременно введение антагониста CTLA4 человека. Способ, например, способ лечения рака, может включать введение сначала антагониста оси PD1/PD-L1 (например, антагониста PD1 человека или PD-L1 человека) и одновременно введение антагониста CTLA4 человека, а затем позже (например, через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня или более) введение ингибитора DGK α и/или DGK ζ .

Способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения рака, такого как рак на поздней стадии, метастатический рак, солидные опухоли, солидные опухоли на поздней стадии, гематологические опухоли, виды рака, которые являются рефрактерными к ингибиторам контрольных точек (или антагонистам контрольных точек), или те, которые прогрессировали после лечения ингибитором контрольных точек.

Неограничивающие примеры рака для лечения включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого,

плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (*например*, светлоклеточную карциному), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (*например*, почечно-клеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (*например*, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак головы и шеи (или карциному), рак желудка, герминогенную опухоль, педиатрическую саркому, синоназальные естественные киллеры, меланому (*например*, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (CNS), первичную лимфому CNS, опухоль ангиогенеза, опухоль оси позвоночника, рак головного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, вызванный воздействием окружающей среды, в том числе вызванный асбестом, рак, связанный с вирусом, или рак вирусного происхождения (*например*, вирус папилломы человека связанные с HPV или происходящие из HPV опухоли)) и гематологические злокачественные новообразования, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. линии миелоидных клеток (которая продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (которая продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки), таких как все типы лейкозов, лимфом и миелом, *например*, острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созревaniem клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7),

изолированная гранулоцитарная саркома и хлором; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные гематологические злокачественные новообразования, *например*, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитоподобная В-клеточная лимфома, ассоциированная со слизистой и лимфоидной тканью лимфома (MALT), анапластическая (*например*, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников; Т-лимфобластная лимфома; и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, В-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая грибовидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмацитоидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая индолентной миеломой), солитарная плазмцитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; гемопоэтические опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; саркомы, тератокарциномы, опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитомы, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, в том числе меланома, пигментная ксеродермия, кератоакантома, саркома, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарцинома, гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, например, Т- и В-клеточные опухоли, в включая, но без ограничения, Т-клеточные нарушения, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и церебриформный клеточный тип; крупнозернистый лимфолейкоз (LGL) Т-клеточного

типа; a/d T-NHL гепатолиенальную лимфому; периферическую/посттимульную Т-клеточную лимфому (плеоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных видов рака. Способы, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для лечения метастатических видов рака, нерезектабельных, рефрактерных видов рака (*например*, видов рака, рефрактерных к предыдущей иммунотерапии, *например*, блокирующим антителом к CTLA-4 или PD-1) и/или рецидивирующих видов рака.

В некоторых вариантах осуществления комбинированное лечение, описанное в настоящем документе, проводят у пациентов, имеющих рак, который продемонстрировал неадекватный ответ на предыдущее лечение или прогрессировал во время предыдущего лечения, *например*, предыдущего лечения иммуноонкологическим или иммунотерапевтическим лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным или резистентным к предыдущему лечению, либо рефрактерным или резистентным по своей природе (*например*, рефрактерным к антагонисту пути PD-1), либо приобрел резистентное или рефрактерное состояние. Например, комбинированное лечение, описанное в настоящем документе, может быть назначено субъектам, которые не реагируют или недостаточно реагируют на первую терапию или у которых наблюдается прогрессирование заболевания после лечения, *например*, лечения антагонистом анти-PD-1 пути, либо отдельно, либо в комбинации с другой терапией (*например*, терапия антагонистом анти-PD-1 пути). В других вариантах осуществления комбинированное лечение, описанное в настоящем документе, проводят у пациентов, которые ранее не получали (*т.е.* не получали лечение) иммуноонкологическим средством, *например*, антагонистом пути PD-1.

Комбинированные методы лечения могут дополнительно включать один или несколько дополнительных методов лечения, таких как облучение, хирургическое вмешательство или химиотерапия.

Описанные в настоящем документе способы также могут быть использованы для лечения пациентов, подвергшихся воздействию определенных токсинов или патогенов, таких как пациенты с инфекционным заболеванием. Соответственно, данное раскрытие также рассматривает способы лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающие проведение у субъекта комбинированного лечения, как описано

в настоящем документе, для лечения у субъекта инфекционного заболевания. Подобно его применению к опухолям, как обсуждалось выше, комбинированное лечение можно использовать в качестве монотерапии или в качестве вспомогательной терапии в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно полезен, включают патогены, против которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, против которых обычные вакцины менее чем полностью эффективны. К ним относятся, но без ограничения, ВИЧ (HIV), гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблии, малярия, лейшманиоз, золотистый стафилококк, синегнойная палочка. Комбинированное лечение может быть полезным против развившихся инфекций агентами, такими как ВИЧ, которые представляют измененные антигены в ходе инфекции.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами, описанными в настоящем документе, включают HIV, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (*например*, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить описанными в настоящем документе способами, включают хламидии, риккетсиозы, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллы, протей, серратию, псевдомонаду, легионеллу, дифтерию, сальмонеллу, палочковидную бактерию, холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерии болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описанными в настоящем документе способами, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, и т.д.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описанными в настоящем документе способами, включают *Entamoeba*

histolytica, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеуказанных способах комбинированное лечение можно сочетать с другими формами иммунотерапии, например, описанными в настоящем документе, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2), или терапией биспецифическими антителами, которая может обеспечить усиленное представление опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту, имеющему рак, ингибитора DGK α и/или DGK ζ в комбинации с антагонистом оси PD1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA4, а также агентом, который ингибирует CD4⁺ Т-клетки, и/или агентом, который стимулирует CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления агенты, которые ингибируют CD4⁺ Т-клетки, и агенты, которые стимулируют CD8⁺ Т-клетки, могут представлять собой агенты, действующие локально в опухолевом окружении.

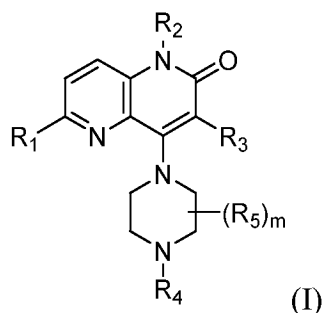
Примеры ингибиторов активности ферментов DGK α и/или DGK ζ

В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой ингибитор DGK α . В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой ингибитор DGK ζ . В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ ингибирует оба фермента. Уровень ингибирования фермента можно измерить, как описано далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ не является значительным ингибитором других ферментов DGK.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает иммунный ответ, например, за счет повышения активности Т-клеток. Например, ингибитор DGK α и/или DGK ζ может усиливать первичную передачу сигналов Т-клетками, о чем свидетельствует, например, усиление передачи сигналов pERK/pPKC, которое можно измерить, как описано далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ обладает одним или несколькими из следующих свойств: (i) он снижает порог стимуляции антигеном; (ii)

увеличивает эффекторную функцию CTL; и (iii) усиливает уничтожение опухолевых клеток. Когда ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает уничтожение опухолевых клеток, эта активность может зависеть от CD8⁺ Т-клеток, как показано, например, на животной модели CT26. Когда ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает уничтожение опухолевых клеток, эта активность может зависеть от NK-клеток, как показано, например, на животной модели CT26. Когда ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает уничтожение опухолевых клеток, эта активность может зависеть от CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток, как показано, например, на животной модели CT26. Когда ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает уничтожение опухолевых клеток, эта активность может быть усилена за счет истощения клеток CD4, например, в животной модели CT-26. В некоторых вариантах осуществления ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает представление антигена тетрамера AH1⁺ в животной модели CT-26. Ингибитор DGK α и/или DGK ζ предпочтительно обладает одним или несколькими из указанных выше свойств и может включать все из них. Наличие этих свойств можно определить путем проведения анализов, описанных в настоящем документе, например, в разделе, озаглавленном «Биологические анализы» в примерах.

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4 и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R₁ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{3–4}

циклоалкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{1–3} алкокси, замещенный 0–4 R_{1a}, –NR_aR_a,

–S(O)_nR_c или –P(O)R_cR_c;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –OCH₃ или –NR_aR_a;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1–3} алкил;

каждый R_c независимо представляет собой C_{3–4} циклоалкил или C_{1–3} алкил,

замещенный 0–4 R_{1a};

R_2 представляет собой H, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{2a} , или C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_{2a} ;

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}(C_{1-2}$ алкил), C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, $-\text{CN}$, C_{1-3} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} фторциклоалкил или $-\text{NO}_2$;

R_4 представляет собой $-\text{CH}_2R_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2R_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CHR}_{4a}R_{4d}$, $-\text{CHR}_{4a}R_{4b}$ или $-\text{CR}_{4a}R_{4b}R_{4c}$;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

(i) C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{NR}_aR_a$, $-\text{S}(\text{O})_2R_e$ или $-\text{NR}_aS(\text{O})_2R_e$;

(ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-4} гидроксialкила, $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(C_{1-3}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-\text{O}(C_{1-4}$ гидроксialкила), $-\text{O}(\text{CH})_{1-3}\text{O}(C_{1-3}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-\text{O}(\text{CH})_{1-3}\text{NR}_cR_c$, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})(C_{1-4}$ алкила), $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(C_{1-4}$ алкила), $-\text{NR}_cR_c$, $-\text{NR}_aS(\text{O})_2(C_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(C_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(C_{1-4}$ алкила), $-\text{P}(\text{O})(C_{1-3}$ алкила) $_2$, $-\text{S}(\text{O})_2(C_{1-3}$ алкила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}(C_{3-6}$ циклоалкила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{морфолинила})$, циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (*трет*-бутоксикарбонил)азетидинила, триазиолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d ; или

(iii) C_{1-4} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{NR}_cR_c$, $-\text{NR}_aS(\text{O})_2(C_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(C_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(C_{1-4}$ алкила) и C_{3-6} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ;

каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкил, C_{1-3}

фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{NR}_cR_c$,

или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероцикла, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

R_{4d} представляет собой $-OCH_3$;

каждый R_c независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, $-CN$, $-CH_3$ и $-OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-4 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил);

каждый R_g представляет собой независимо F, Cl, $-CN$, $-OH$, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкил) или $-NR_cR_c$;

m равен 0, 1, 2 или 3; и

n равен 0, 1 или 2.

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-CN$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , циклопропил, замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ или $-P(O)(CH_3)_2$;

каждый R_{1a} представляет собой независимо F, Cl или $-CN$;

каждый R_a представляет собой независимо H или C_{1-3} алкил;

R_2 представляет собой H или C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} ;

каждый R_{2a} представляет собой независимо F, Cl, $-CN$, $-OH$, $-O(C_{1-2}$ алкил),

циклопропил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, $-CN$, C_{1-2} алкил, $-CF_3$, циклопропил или $-NO_2$;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) C_{1-4} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-CN$, $-OH$, $-OCH_3$, $-SCH_3$, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_aR_a$;
- (ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, при этом каждый замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-CN$, $-OH$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, $-CH_2OH$, $-(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-O(C_{1-4}$ гидроксильного алкила), $-O(CH)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH)_{1-2}NR_cR_c$, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-C(O)(C_{1-4}$ алкила), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-P(O)(C_{1-2}$ алкила) $_2$, $-S(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-O(CH_2)_{1-2}(C_{3-4}$ циклоалкила), $-O(CH_2)_{1-2}$ (морфолинила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (*трет*-бутоксикарбонил)азетидинила, триазиола, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d ; или
- (iii) C_{1-3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, фенила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-3} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила) и C_{3-4} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6}

циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ;

каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-4} алкил, C_{1-2}

фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$,

или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного

гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического

гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями,

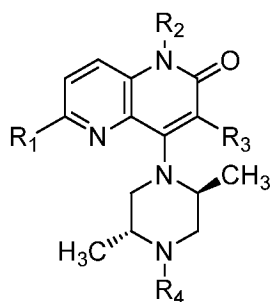
независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-4} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3}

алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-4} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

и каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-5} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-3 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-3 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероцикл, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил).

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соли, имеющее структуру:



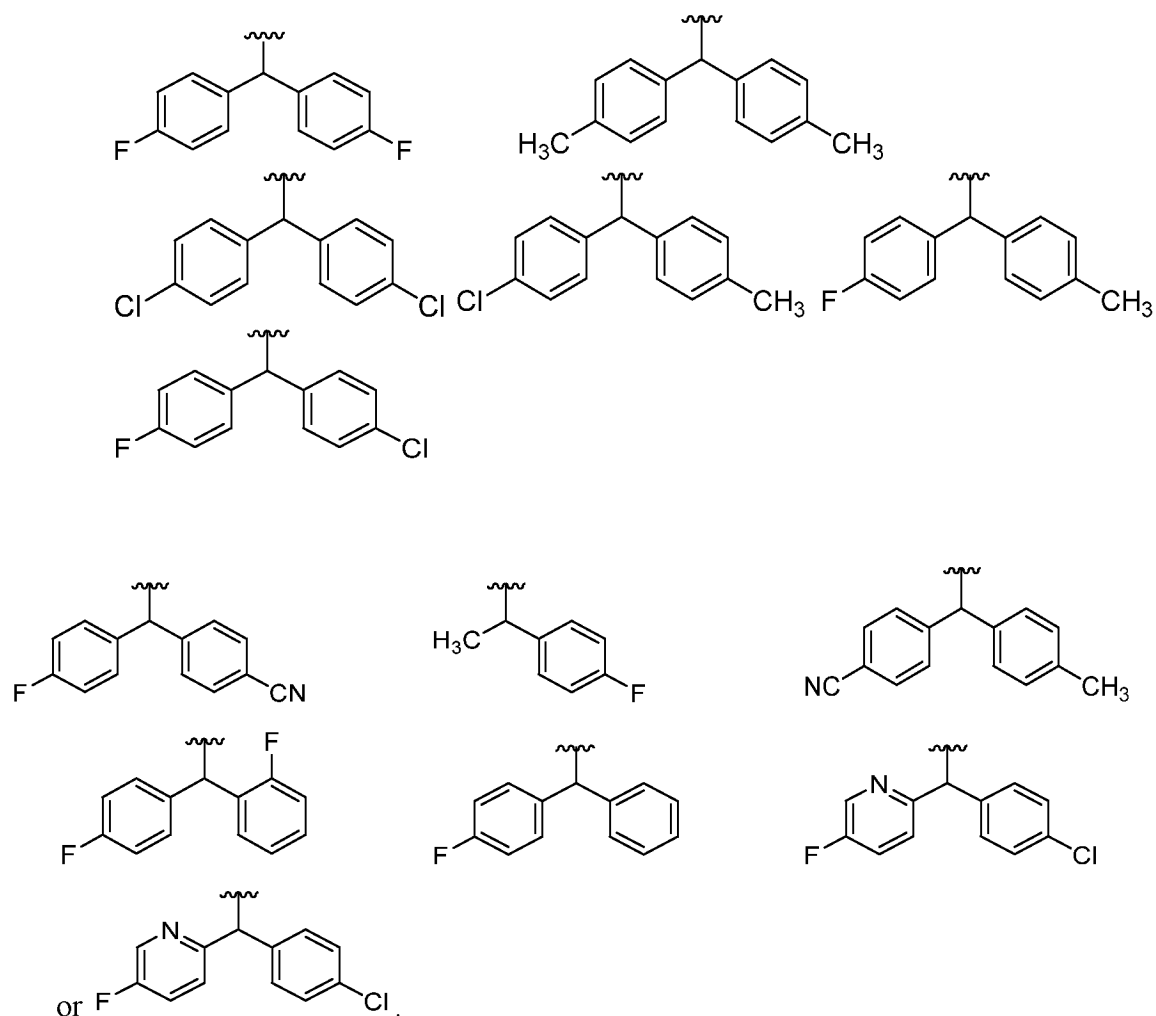
где:

R_1 представляет собой $-CN$;

R_2 представляет собой $-CH_3$;

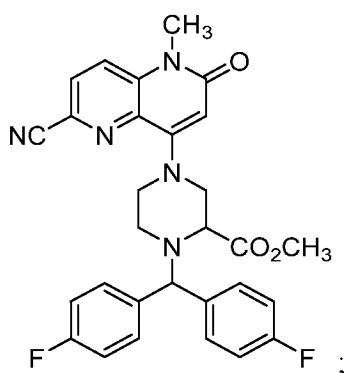
R_3 представляет собой H, F или $-CN$;

R_4 представляет собой:

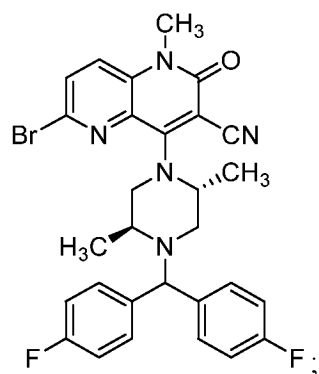


Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее одну из следующих структур или формул (или их изомер):

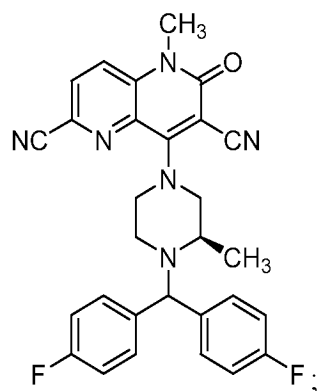
Метил-1-(бис(4-фторфенил)метил)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)пиперазин-2-карбоксилат



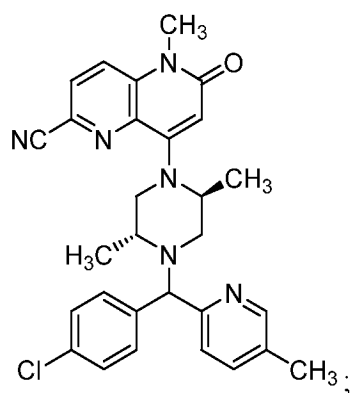
4-((2R,5S)-4-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрил



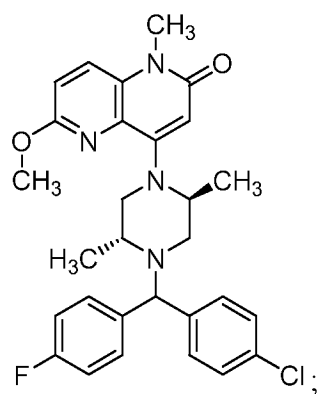
(R)-8-(4-(бис(фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2,7-дикарбонитрил



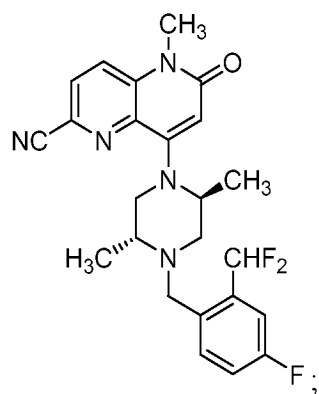
8-[(2S,5R)-4-[(4-хлорфенил)(5-метилпиридин-2-ил)метил]-2,5-диметилпиперазин]-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



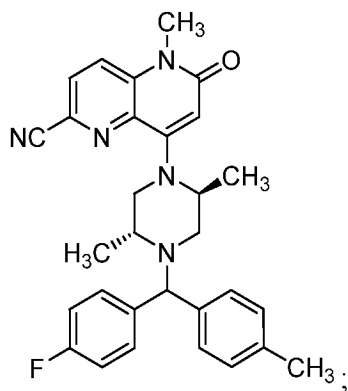
4-[(2S,5R)-4-[(4-хлорфенил)(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-6-метокси-1-метил-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-2-он



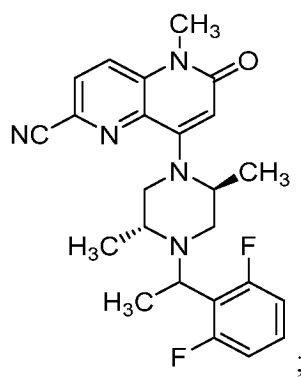
8-[(2S,5R)-4-{[2-(дифторметил)-фторфенил]метил}-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



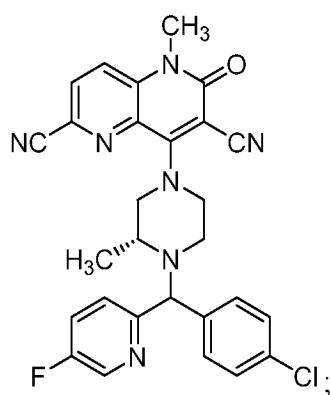
8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(4-метилфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



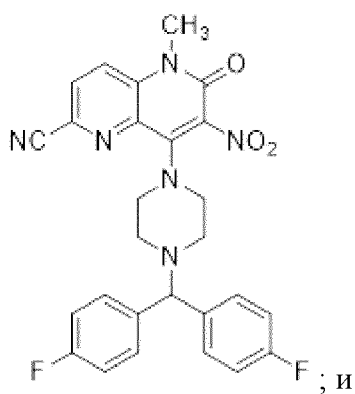
8-[(2S,5R)-4-[1-(2,6-дифторфенил)этил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



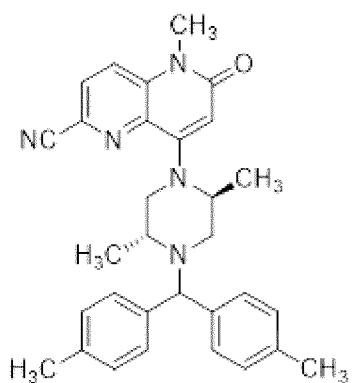
8-((3R)-4-((4-хлорфенил)(5-фторпиридин-2-ил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2,7-дикарбонитрил



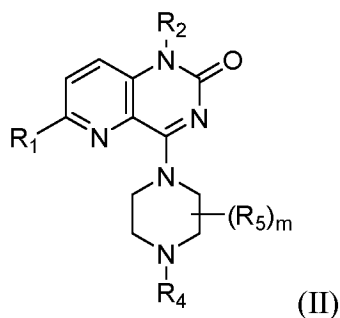
8-(4-(бис(фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



8-[(2S,5R)-4-[бис(4-метилфенил)метил]-2,диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (II):



или его соль, где:

R₁ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{3–4} циклоалкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{1–3} алкокси, замещенный 0–4 R_{1a}, –NR_aR_a, –S(O)_nR_e или –P(O)R_eR_e;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –OCH₃ или –NR_aR_a;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1–3} алкил;

каждый R_e независимо представляет собой C_{3–4} циклоалкил или C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a};

R₂ представляет собой H, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{2a}, или C_{3–4} циклоалкил, замещенный 0–4 R_{2a};

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –O(C_{1–2} алкил), C_{3–4} циклоалкил, C_{3–4} алкенил или C_{3–4} алкинил;

R₄ представляет собой –CH₂R_{4a}, –CH₂CH₂R_{4a}, –CH₂CHR_{4a}R_{4d}, –CHR_{4a}R_{4b} или –CR_{4a}R_{4b}R_{4c};

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) $-\text{CN}$ или C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F , Cl , $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_c$ или $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2\text{R}_c$;
- (ii) C_{3-6} циклоалкил, 4-10-членный гетероцикл, фенил или 5-10-членный гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F , Cl , Br , $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-2} бромалкила, C_{1-2} цианоалкила, C_{1-4} гидроксиалкила, $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-3}$ алкила), C_{1-4} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, C_{1-3} цианоалкокси, $-\text{O}(\text{C}_{1-4}$ гидроксиалкила), $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-3}\text{O}(\text{C}_{1-3}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-3}\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{CH}_2\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила) $_2$, $-\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{C}_{3-4}$ циклоалкила), $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{морфолинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{диформорфолинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{диметилморфолинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{оксаазабицикло}[2.2.1]\text{гептанила})$, $(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{оксаазаспиро}[3.3]\text{гептанила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{метилпиперазинонила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{ацетилпиперазинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{пиперидинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{дифторпиперидинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{метоксипиперидинила})$, $-(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{гидроксипиперидинила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{C}_{3-6}$ циклоалкила), $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{метилциклопропила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}((\text{этоксикарбонил})\text{циклопропила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{оксетанила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{метилазетидинила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{тетрагидропиранила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}(\text{морфолинила})$, $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{0-2}(\text{триазила})$, циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, триазила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила, диоксоланила, пирролидинонила и R_d ; или
- (iii) C_{1-4} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, 4-10-членного гетероцикла, моно или бициклического арила или 5-10-членного гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F , Cl , Br , $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила)

и C_{3-6} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f , каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкил, C_{1-3} фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

R_{4d} представляет собой $-OCH_3$;

каждый R_c независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, $-CN$, $-CH_3$ и $-OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-4 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (4-10-членный гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил);

каждый R_g независимо представляет собой F, Cl, $-CN$, $-OH$, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкил) или $-NR_cR_c$;

m равно 0, 1, 2 или 3; и

n равно 0, 1 или 2.

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и

ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R₁ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a},

циклопропил, замещенный 0–3 R_{1a}, C_{1–3} алкокси, замещенный 0–3 R_{1a}, –NR_aR_a,
–S(O)_nCH₃ или –P(O)(CH₃)₂;

R₂ представляет собой H или C_{1–2} алкил, замещенный 0–2 R_{2a};

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –O(C_{1–2} алкил),

циклопропил, C_{3–4} алкенил или C_{3–4} алкинил;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

(i) –CN или C_{1–4} алкил, замещенный 0–4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –CN, –OH, –OCH₃, –SCH₃, C_{1–3} фторалкокси и –NR_aR_a;

(ii) C_{3–6} циклоалкил, 4–10-членный гетероцикл, фенил или 5–10-членный гетероарил, каждый из которых замещен 0–4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1–6} алкила, C_{1–3} фторалкила, C_{1–2} бромалкила, C_{1–2} цианоалкила, C_{1–2} гидроксиалкила, –CH₂NR_aR_a, –(CH₂)_{1–2}O(C_{1–2} алкила), –(CH₂)_{1–2}NR_xC(O)O(C_{1–2} алкила), C_{1–4} алкокси, –O(C_{1–4} гидроксиалкила), –O(CR_xR_x)_{1–2}O(C_{1–2} алкила), C_{1–3} фторалкокси, C_{1–3} цианоалкокси, –O(CH₂)_{1–2}NR_cR_c, –OCH₂CH=CH₂, –OCH₂C $\equiv$ CH, –C(O)(C_{1–4} алкила), –C(O)OH, –C(O)O(C_{1–4} алкила), –NR_cR_c, –NR_aS(O)₂(C_{1–3} алкила), –NR_aC(O)(C_{1–3} алкила), –NR_aC(O)O(C_{1–4} алкила), –P(O)(C_{1–2} алкила)₂, –S(O)₂(C_{1–3} алкила), –(CH₂)_{1–2}(C_{3–4} циклоалкила), –CR_xR_x(морфолинила), –CR_xR_x(диформорфолинила), –CR_xR_x(диметилморфолинила), –CR_xR_x(оксаазабицикло[2.2.1]гептанила), –CR_xR_x(оксаазаспиро[3.3]гептанила), –CR_xR_x(метилпиперазинонила), –CR_xR_x(ацетилпиперазинила), –CR_xR_x(пиперидинила), –CR_xR_x(дифторпиперидинила), –CR_xR_x(метоксипиперидинила), –CR_xR_x(гидроксипиперидинила), –O(CH₂)_{0–2}(C_{3–4} циклоалкила), –O(CH₂)_{0–2}(метилциклопропила), –O(CH₂)_{0–2}((этоксикарбонил)циклопропила), –O(CH₂)_{0–2}(оксетанила), –O(CH₂)_{0–2}(метилазетидинила), –O(CH₂)_{1–2}(морфолинила), –O(CH₂)_{0–2}(тетрагидропиранила), –O(CH₂)_{0–2}(тиазолила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, диоксоланила, пирролидинонила, триазила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила,

метилпиперидинила, и R_d ; или

- (iii) C_{1-3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, 4-10-членного гетероциклила, моно- или бициклического арила или 5-10-членного гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-3} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)O(C_{1-4} \text{ алкила})$ и C_{3-4} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-4} алкил, C_{1-2}

фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$ или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-4} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-4} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

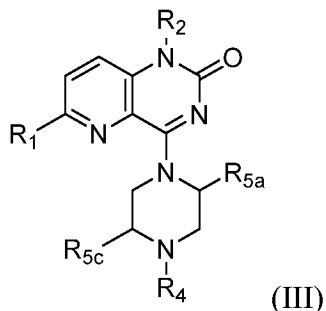
каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-5} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-3 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-3 R_g , $-(CH_2)_{1-2}(4-10\text{-членный гетероциклил, замещенный } 0-4 R_g)$, $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4} \text{ алкил})$, $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4} \text{ алкил})$, $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4} \text{ алкил})$, $-C(O)(C_{1-4} \text{ алкил})$, $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4} \text{ алкил})$, $-C(O)O(C_{3-4} \text{ циклоалкил})$, $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4} \text{ циклоалкил})$;

каждый R_x независимо представляет собой H или $-CH_3$; и

m равно 1, 2 или 3.

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и

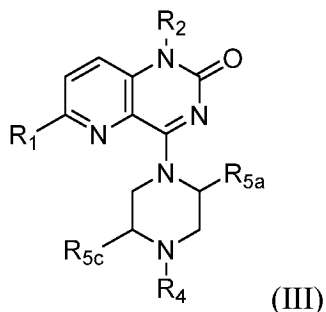
ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, где m равно 2; один R_5 представляет собой R_{5a} , а другой R_5 представляет собой R_{5c} ; и указанное соединение имеет структуру формулы (III):



R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; и

R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль, где



R_1 представляет собой $-\text{CN}$;

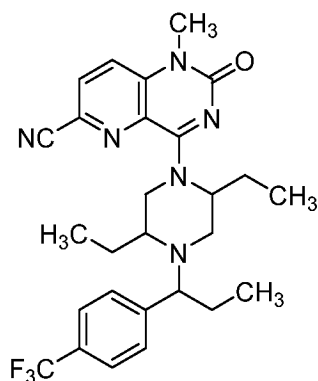
R_2 представляет собой $-\text{CH}_3$;

R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; и

R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

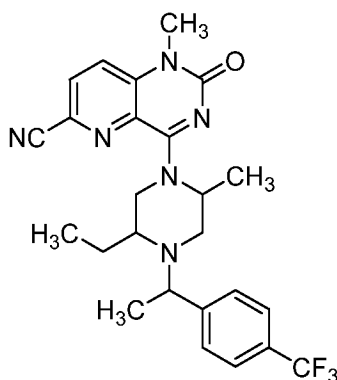
Способ лечения заболевания, такого как рак, может включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4, и ингибитора DGK α и/или DGK ζ , представляющего собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее одну из следующих структур:

4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо [3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



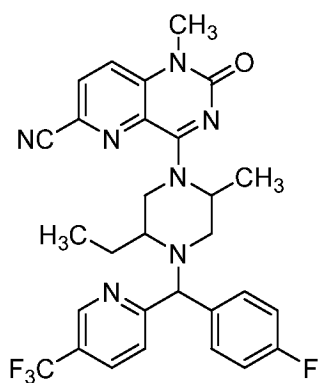
включая 4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтил-4-((*S*)-1-(4-(трифторметил)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтил-4-((*R*)-1-(4-(трифторметил)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил,



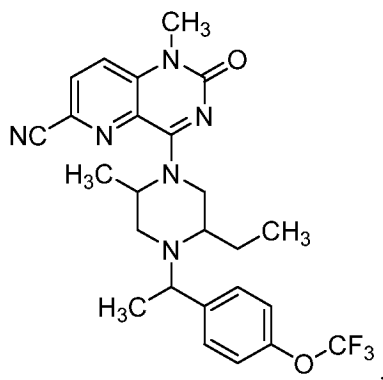
включая 4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метил-4-((*S*)-1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метил-4-((*R*)-1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2*S*,5*R*)-5-этил-4-((4-фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил,



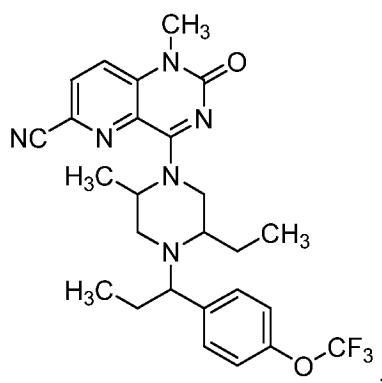
включая 4-((2S,5R)-5-этил-4-((S)-(4-фторфенил)(5-(трифторметил) пиридин-2-ил) метил)-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d] пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-5-этил-4-((R)-(фторфенил)(5-(трифторметил) пиридин-2-ил)метил)-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d] пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметокси) фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



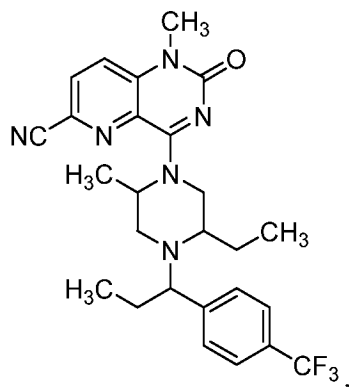
включая 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((S)-1-(4-(трифторметокси)фенил)этил) пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((R)-1-(4-(трифторметокси) фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметокси) фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



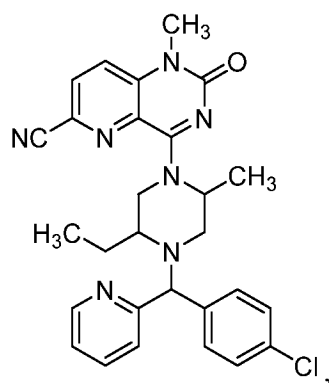
включая 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((S)-1-(4-(трифторметокси)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((R)-1-(4-(трифторметокси) фенил)propyl)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил) пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



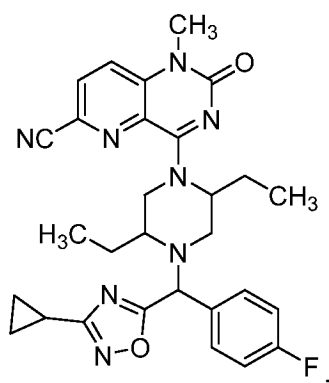
включая 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((S)-1-(4-(трифторметил)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-((R)-1-(4-(трифторметил) фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-4-((4-хлорфенил)(пиридин-2-ил)метил)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ид)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



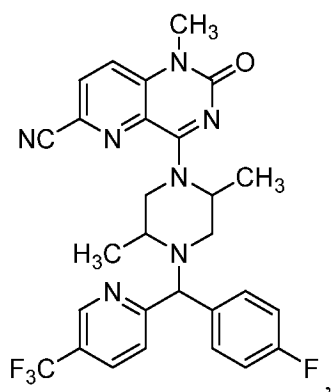
включая 4-((2*S*,5*R*)-4-((*R*)-(4-хлорфенил)(пиридин-2-ил)метил)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2*S*,5*R*)-4-((*S*)-(4-хлорфенил)(пиридин-2-ил)метил)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2*S*,5*R*)-4-((3-циклопропил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)(фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



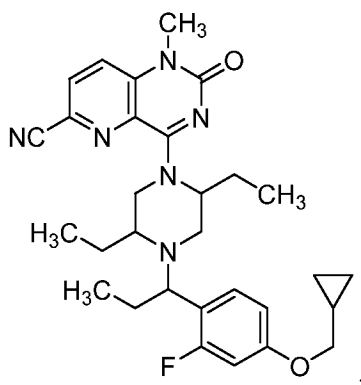
включая 4-((2*S*,5*R*)-4-((*R*)-(3-циклопропил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)(4-фторфенил)метил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2*S*,5*R*)-4-((*S*)-(3-циклопропил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)(4-фторфенил)метил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2*S*,5*R*)-4-((фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



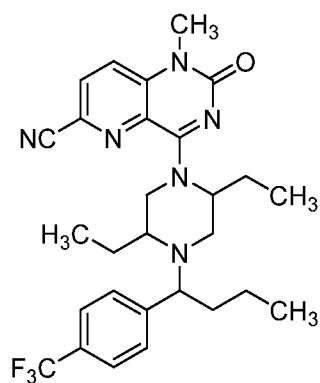
включая 4-((2S,5R)-4-((S)-(фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d] пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-4-((R)-(4-фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2,5-диметилпиперазин)-1-метил-2-охо-1,2-дигидропиридо[3,2-d] пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-4-(1-(4-(циклопропилметокси)-2-фторфенил)пропил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2 -дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



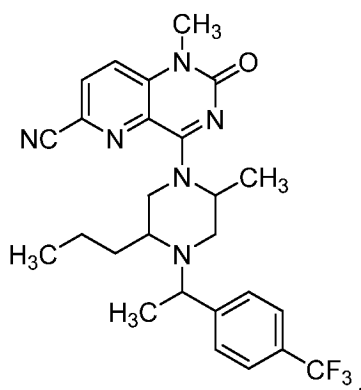
включая 4-((2S,5R)-4-((S)-1-(4-(циклопропилметокси)-2-фторфенил)пропил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2- оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-4-((R)-1-(4-(циклопропилметокси)-2-фторфенил)пропил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил;

4-((2S,5R)-2,5-диэтил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)бутил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо [3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



включая 4-((2S,5R)-2,5-диэтил-4-((S)-1-(4-(трифторметил)фенил)бутил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 4-((2S,5R)-2,5-диэтил-4-((R)-1-(4-(трифторметил)фенил)бутил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил;

1-метил-4-((2S,5R)-2-метил-5-пропил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



включая 1-метил-4-((2S,5R)-2-метил-5-пропил-4-((S)-1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил и 1-метил-4-((2S,5R)-2-метил-5-пропил-4-((R)-1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил.

Антагонисты оси PD1/PD-L1

Антагонисты оси PD1/PD-L1, которые можно комбинировать с ингибиторами DGK, включают следующее.

Антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антагонист PD1 человека или антагонист PD-L1 человека, который стимулирует иммунный ответ путем ингибирования отрицательных контрольных точек. Антагонист может представлять

собой молекулу любого типа, например белок, нуклеиновую кислоту или небольшую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD1 человека или PD-L1 человека.

Анти-PD-1 антитела, известные в данной области, можно использовать в описанных в настоящем документе способах. Различные человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью, раскрыты в патенте США № 8008449. Антитела человека против PD-1, раскрытые в патенте США № 8008449, демонстрируют одну или несколько из следующих характеристик: (a) связываются с PD-1 человека с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или менее, по данным определения с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы Biacore; (b) по существу не связываются с CD28, CTLA-4 или ICOS человека; (c) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR); (d) увеличивают продуцирование интерферона-гамма в анализе MLR; (e) увеличивают секрецию IL-2 в анализе MLR; (f) связываются с PD-1 человека и PD-1 яванского макака; (g) ингибируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1; (h) стимулируют антигенспецифические ответные реакции памяти; (i) стимулируют ответные реакции антител; и (j) ингибируют рост опухолевых клеток *in vivo*. Анти-PD-1 антитела, используемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и проявляют по меньшей мере одну, а в некоторых аспектах по меньшей мере пять из указанных выше характеристик.

Другие моноклональные антитела против PD-1 описаны, например, в патентах США № 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, публикации США № 2016/0272708 и публикациях PCT №№ WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, WO 2017/19846, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540, каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

В некоторых аспектах анти-PD-1 антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба (также известного как OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-

4538), пембролизумаба (Merck; также известного как KEYTRUDA®, ламбролизумаб и МК-3475; см. WO 2008/156712), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; также известного как AMP-514; см. WO 2012/145493), цемиплимаба (Regeneron; также известного как REGN-2810; см. WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; также известного как торипалимаб; см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), синтилимаба, BGB-A317 (Beigene; также известного как тислелизумаб; см. WO 2015/35606 и US 2015/0079109), INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; также известного как SHR-1210; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), TSR-042 (Tesarо Biopharmaceutical; также известного как ANB011; см. WO 2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; также известного как WBP3055; см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790), MGA012 (MacroGenics, см. WO 2017/19846), BCD-100 (Biocad; Kaplon et al., mAbs 10(2):183-203 (2018), и IBI308 (Innovent; см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540).

В одном аспекте анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой полностью человеческое IgG4 (S228P) антитело, действующее как ингибитор иммунных контрольных точек PD-1, которое избирательно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), тем самым блокируя понижающую регуляцию противоопухолевых функций Т-клеток (патент США 8008449; Wang et al., 2014 Cancer Immun Res.2(9):846-56).

В другом аспекте анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4 (S228P), направленное против рецептора клеточной поверхности человека PD-1 (программируемой смерти-1 или программируемой клеточной смерти-1). Пембролизумаб описан, например, в патентах США № 8354509 и 8900587.

Анти-PD-1 антитела, используемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека с любым описанным в настоящем документе антителом к PD-1, например, ниволумабом (см., например, патенты США №№ 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). В некоторых аспектах анти-PD-1 антитело связывается с тем же эпитопом, что и любое из анти-PD-1 антител, описанных в настоящем документе, например, ниволумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что данные

моноклональные антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с областью данного конкретного эпитопа. Ожидается, что такие перекрестно-конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например, ниволумаба, в силу их связывания с той же эпитопной областью PD-1. Перекрестно-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основе их способности к перекрестной конкуренции с ниволумабом в стандартных анализах связывания PD-1, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых аспектах антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-1 или связываются с той же эпитопной областью антитела к PD-1 человека, что и ниволумаб, представляют собой моноклональные антитела. В целях введения людям такие перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-PD-1 антитела, применяемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие фрагменты указанных выше антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антител может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-PD-1 антитела, подходящие для применения в раскрытых композициях и способах, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 и ингибируют иммуносупрессивное действие PD-1 сигнального пути. В любой из композиций или в любом из способов, описанных в настоящем документе, анти-PD-1 «антитело» включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с рецептором PD-1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные таковым целых антител, в ингибировании связывания лиганда и в повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых аспектах анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ниволумабом за связывание с PD-1 человека.

В некоторых аспектах антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антагонист PD-L1. Анти-PD-L1 антитела, известные в данной области, можно использовать в композициях и способах настоящего изобретения. Примеры анти-PD-L1

антител, применимых в композициях и способах по настоящему изобретению, включают антитела, раскрытые в патенте США № 9580507. Было показано, что человеческие моноклональные анти-PD-L1 антитела, раскрытые в патенте США № 9580507, обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (a) связываются с PD-L1 человека с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или менее, по данным поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы Biacore; (b) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR); (c) увеличивают продуцирование интерферона-гамма в анализе MLR; (d) увеличивают секрецию IL-2 в анализе MLR; (e) стимулируют ответные реакции антител; и (f) изменяют эффект Т-регуляторных клеток на эффекторные Т-клетки и/или дендритные клетки. Анти-PD-L1 антитела, используемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и проявляют по меньшей мере одну, а в некоторых аспектах по меньшей мере пять из перечисленных выше характеристик.

В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело выбрано из группы, состоящей из BMS-936559 (также известного как 12A4, MDX-1105; см., например, патент США № 7943743 и WO 2013/173223), атезолизумаб (Roche; также известный как TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; см. US 8217149; см. также Herbst et al. (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000), дурвалумаб (AstraZeneca; также известный как IMFINZI™, MEDI-4736; см. WO 2011/066389), авелумаб (Pfizer; также известный как BAVENCIO®, MSB-0010718C; см. WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; см. WO 2013/181634), CX-072 (Cytomx; см. WO 2016/ 149201), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang et al., Cell Discov. 7:3 (март 2017 г.), LY3300054 (Eli Lilly Co.; см., например, WO 2017/034916), BGB-A333 (BeiGene; см. Desai et al., JCO 36 (15suppl):TPS3113 (2018) и CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik et al., AACR: Abstract 4606 (Apr 2016)).

В некоторых аспектах антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). Атезолизумаб представляет собой полностью гуманизированное моноклональное антитело IgG1 к PD-L1.

В некоторых аспектах антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI™). Дурвалумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1 каппа к PD-L1.

В некоторых аспектах антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®). Авелумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1 ламбда к PD-L1.

Анти-PD-L1 антитела, применяемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-L1 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 с любым антителом против PD-L1, описанным в настоящем документе, например, атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом. В некоторых аспектах нати-PD-L1 антитело связывается с тем же эпитопом, что и любое из анти-PD-L1 антител, описанных в настоящем документе, например, атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что данные антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с областью данного конкретного эпитопа. Ожидается, что такие перекрестно конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например, атезолизумаба и/или авелумаба, в силу их связывания с той же эпитопной областью PD-L1. Перекрестно-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основе их способности к перекрестной конкуренции с атезолизумабом и/или авелумабом в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых аспектах антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 или связываются с той же эпитопной областью человеческого PD-L1, что и атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб, являются моноклональными антителами. В целях введения людям такие перекрестно-конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные, или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-PD-L1 антитела, применяемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие фрагменты вышеуказанных антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-PD-L1 антитела, подходящие для применения в раскрытых способах, представляют собой антитела, которые связываются с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-1 и ингибируют иммуносупрессивное действие сигнального пути PD-1. В любом из способов,

описанных в настоящем документе, анти-PD-L1 «антитело» включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с PD-L1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные таковым целых антител, в ингибировании связывания рецептора и повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом за связывание с человеческим PD-L1.

Анти-PD-L1 антитело, подходящее для применения в настоящем изобретении, может представлять собой любое антитело к PD-L1, которое специфически связывается с PD-L1, например, антитела, которые перекрестно конкурируют с дурвалумабом, авелумабом или атезолизумабом за связывание с человеческим PD-1, например, антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и дурвалумаб, авелумаб или атезолизумаб. В конкретном аспекте анти-PD-L1 антитело представляет собой дурвалумаб. В других аспектах анти-PD-L1 антитело представляет собой авелумаб. В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело представляет собой атезолизумаб.

Антагонисты CTLA4

Антагонисты CTLA4, которые можно комбинировать с ингибиторами DGK, включают следующие.

Антагонист CTLA-4 представляет собой антагонист человеческого CTLA-4, который стимулирует иммунный ответ путем ингибирования отрицательной контрольной точки. Антагонист может представлять собой молекулу любого типа, например, белок, нуклеиновую кислоту или небольшую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело, которое специфически связывается с человеческим CTLA-4.

Анти-CTLA-4 антитела, известные в данной области, можно использовать в способах по настоящему изобретению. Анти-CTLA-4 антитела по настоящему изобретению связываются с человеческим CTLA-4 с тем, чтобы нарушить взаимодействие CTLA-4 с рецептором B7 человека. Поскольку взаимодействие CTLA-4 с B7 трансдуцирует сигнал, ведущий к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, повышает или пролонгирует активацию таких Т-клеток, тем самым индуцируя, увеличивая или продлевая иммунный ответ.

Моноклональные человеческие антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 с высокой аффинностью, раскрыты в патенте США № 6984720. Другие

моноклональные анти-CTLA-4 антитела описаны, например, в патентах США №№ 5977318, 6051227, 6682736 и 7034121 и международных публикациях №№ WO 2012/122444, WO 2007/113648, WO 2016/196237 и WO 2000/037504, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Было продемонстрировано, что моноклональные человеческие анти-CTLA-4 антитела, раскрытые в патенте США №№ 6984720, обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (а) специфически связываются с человеческим CTLA-4 с аффинностью связывания, отражаемой равновесной константой ассоциации (K_a), составляющей по меньшей мере примерно 10^7 M^{-1} или примерно 10^9 M^{-1} , или примерно от 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} или выше, как определено с помощью анализа Biacore; (b) кинетическая константа ассоциации (K_a) составляет по меньшей мере примерно 10^3 , примерно 10^4 или примерно $10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$; (c) кинетическая константа диссоциации (k_d) составляет по меньшей мере примерно 10^3 , примерно 10^4 или примерно $10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$; и (d) ингибирует связывание CTLA-4 с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Анти-CTLA-4 антитела, применяемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и проявляют по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три из перечисленных выше характеристик.

В некоторых аспектах антитело к CTLA-4 выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба (также известного как YERVOY®, MDX-010, 10D1; см. патент США № 6984720), МК-1308 (Merck), AGEN-1884 (Agenus Inc.; см. WO 2016/196237) и тремелимумаба (AstraZeneca; также известного как тицилимумаб, CP-675,206; см. WO 2000/037504 и Ribas, Update Cancer Ther. 2(3): 133-39 (2007)). В конкретных аспектах анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб.

В конкретных аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб для применения в раскрытых здесь способах. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, которое блокирует связывание CTLA-4 с его лигандами B7, тем самым стимулируя активацию Т-клеток и улучшая общую выживаемость (OS) у пациентов с меланомой на поздней стадии.

В конкретных аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой тремелимумаб.

В конкретных аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой МК-1308.

В конкретных аспектах антитело к CTLA-4 представляет собой AGEN-1884.

Анти-CTLA-4 антитела, применяемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 человека и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 с любым анти-CTLA-4 антителом, описанным в настоящем документе, например, ипилимумабом и/или тремелиумабом. В некоторых аспектах антитело к CTLA-4 связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител к CTLA-4, описанных в настоящем документе, например, ипилимумаб и/или тремелиумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что данные антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически препятствуют связыванию других перекрестно конкурирующих антител с областью данного конкретного эпитопа. Ожидается, что такие перекрестно конкурирующие антитела будут иметь функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например, ипилимумаба и/или тремелиумаба, в силу их связывания с одной и той же эпитопной областью CTLA-4. Перекрестно-конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основе их способности к перекрестной конкуренции с ипилимумабом и/или тремелиумабом в стандартных анализах связывания CTLA-4, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых аспектах антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 или связываются с той же эпитопной областью человеческого антитела к CTLA-4, что и ипилимумаб и/или тремелиумаб, являются моноклональными антителами. В целях введения людям такие перекрестно-конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-CTLA-4 антитела, применяемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие фрагменты вышеуказанных антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-CTLA-4 антитела, подходящие для применения в раскрытых способах, представляют собой антитела, которые связываются с CTLA-4 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют активность CTLA-4 и нарушают взаимодействие CTLA-4 с человеческим рецептором B7. В любой из композиций или

способов, описанных в настоящем документе, анти-CTLA-4 «антитело» включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с CTLA-4 и проявляет функциональные свойства, аналогичные таковым целых антител, в ингибировании взаимодействия CTLA-4 с человеческим рецептором B7 и повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых аспектах анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ипилимумабом и/или тремелимуабом за связывание с человеческим CTLA-4.

Антагонисты CTLA4 также включают варианты антител к CTLA4. Примерами вариантов антител к CTLA4 являются нефукозилированные анти-CTLA4 антитела, такие как нефукозилированный ипилимумаб, активируемые антитела к CTLA4, имеющие маску, которая избирательно расщепляется в опухолях, например, активируемый ипилимумаб, или активируемые нефукозилированные анти-CTLA-4 антитела. Типичные нефукозилированные и/или активируемые анти-CTLA4 антитела, например, ипилимумаб, представлены в WO 2014/089113 и WO 2018/085555.

Введение ингибиторов DGK α и/или DGK ζ и антагонистов оси PD1/PD-L1 или CTLA4

Соединения, описанные в настоящем документе, например, в соответствии с формулой (I) или (II), такие как соединение, выбранное из соединений с 1 по 34, и/или их фармацевтически приемлемые соли, можно вводить любым способом, подходящим для состояния, подлежащего лечению, который может зависеть от необходимости специфического для конкретного участка лечения или от количества соединения, подлежащего доставке.

Также, в настоящем документе охвачен класс фармацевтических композиций, содержащих соединение, например, соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или его фармацевтически приемлемую соль; и один или несколько нетоксичных, фармацевтически приемлемых носителей, и/или разбавителей, и/или адъювантов (совместно называемых в настоящем документе как материалы-«носители») и, при желании, другие активные ингредиенты. Соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такие как соединение, выбранное из соединений 1-34, можно вводить любым подходящим путем, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, адаптированной для такого пути, и в дозе, эффективной для предполагаемого лечения. Соединения и композиции, описанные в настоящем документе, можно, например, вводить перорально, через

слизистую оболочку или парентерально, включая внутрисосудистое, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное и интрастернальное введение в стандартных дозированных составах, содержащих общепринятые фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и носители. Например, фармацевтический носитель может содержать смесь маннита или лактозы и микрокристаллической целлюлозы. Смесь может содержать дополнительные компоненты, такие как смазывающий агент, например, стеарат магния, и разрыхлитель, такой как кросповидон. Смесь носителя может быть помещена в желатиновую капсулу или спрессована в виде таблетки. Фармацевтическую композицию можно вводить, например, в виде пероральной лекарственной формы или инфузии.

Для перорального введения описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может быть в форме, например, таблетки, капсулы, жидкой капсулы, суспензии или жидкости. Фармацевтическая композиция предпочтительно выполнена в виде дозированной единицы, содержащей определенное количество активного ингредиента. Например, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде таблетки или капсулы, содержащей активный ингредиент в количестве в диапазоне от примерно 0,1 до 1000 мг, предпочтительно от примерно 0,25 до 250 мг и более предпочтительно от примерно 0,5 до 100 мг. Подходящая суточная доза для человека или другого млекопитающего может широко варьироваться в зависимости от состояния пациента и других факторов, но ее можно определить с помощью обычных методов.

Любая рассматриваемая в настоящем документе фармацевтическая композиция может, например, доставляться перорально посредством любых приемлемых и подходящих пероральных препаратов. Примеры пероральных препаратов включают, но без ограничения, например, таблетки, троше, пастилки, водные и масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые и мягкие капсулы, жидкие капсулы, сиропы и эликсиры. Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального введения, могут быть изготовлены любыми способами, известными в данной области для производства фармацевтических композиций, предназначенных для перорального введения. Для получения фармацевтически привлекательных препаратов фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере один агент, выбранный из подсластителей, ароматизаторов, красителей, смягчающих средств, антиоксидантов и консервантов.

Таблетка может быть изготовлена, например, путем смешивания по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений с 1 по 34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли, по меньшей мере с одним нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, пригодным для изготовления таблеток. Примеры вспомогательных веществ включают, но без ограничения, например, инертные разбавители, такие как, например, карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция и фосфат натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, кукурузный крахмал и альгиновая кислота; связывающие агенты, такие как, например, крахмал, желатин, поливинилпирролидон и арабийская камедь; и смазывающие агенты, такие как, например, стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. Кроме того, таблетка может быть либо непокрытой, либо покрытой известными методами с целью маскировки неприятного вкуса лекарственного средства с неприятным вкусом, либо для замедления распада и всасывания активного ингредиента в желудочно-кишечном тракте, тем самым поддерживая действие активного ингредиента в течение более длительного периода времени. Примеры водорастворимых материалов, маскирующих вкус, включают, но без ограничения, гидроксипропилметилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу. Примеры материалов с задержкой по времени включают, но без ограничения, этилцеллюлозу и бутират ацетата целлюлозы.

Твердые желатиновые капсулы могут быть изготовлены, например, путем смешивания по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним инертным твердым разбавителем, таким как, например, карбонат кальция; фосфат кальция; и каолин.

Мягкие желатиновые капсулы могут быть изготовлены, например, путем смешивания по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним водорастворимым носителем, таким как, например, полиэтиленгликоль; и по меньшей мере одной масляной средой, такой как, например, арахисовое масло, жидкий парафин и оливковое масло.

Водную суспензию можно приготовить, например, путем смешивания по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли, по меньшей мере с одним вспомогательным веществом, подходящим для изготовления водной суспензии. Примеры вспомогательных веществ, пригодных для изготовления водной суспензии, включают, но без ограничения, например, суспендирующие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, альгиновая кислота, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие агенты, такие как, например, фосфатид природного происхождения, например, лецитин; продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, такие как, например, полиоксиэтиленстеарат; продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, такими как, например, гептадекаэтилен-оксицетанол; продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами жирных кислот и гекситола, такие как, например, моноолеат полиоксиэтиленсорбита; и продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами жирных кислот и ангидридами гекситола, такие как, например, полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водная суспензия также может содержать по меньшей мере один консервант, такой как, например, этил- и н-пропил-п-гидроксibenзоат; по меньшей мере один краситель; по меньшей мере один ароматизатор; и/или по меньшей мере один подсластитель, включая, но без ограничения, например, сахарозу, сахарин и аспартам.

Масляные суспензии можно, например, приготовить путем суспендирования по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли, либо в растительном масле, таком как, например, арахисовое масло; оливковом масле; кунжутном масле; и кокосовом масле; или в минеральном масле, таком как, например, жидкий парафин. Масляная суспензия также может содержать по меньшей мере один загуститель, такой как, например, пчелиный воск; твердый парафин; и цетиловый спирт. Чтобы получить приятную на вкус маслянистую суспензию, к маслянистой суспензии можно добавить по меньшей мере один из подсластителей, уже описанных выше, и/или по меньшей мере один ароматизатор. Масляная суспензия может дополнительно содержать по меньшей мере

один консервант, включая, но без ограничения, например, антиоксидант, такой как, например, бутилированный гидроксианизол и альфа-токоферол.

Диспергируемые порошки и гранулы можно, например, получить путем смешивания по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним диспергирующим и/или смачивающим агентом; по меньшей мере одним суспендирующим агентом; и/или по меньшей мере одним консервантом. Подходящие диспергирующие агенты, смачивающие агенты и суспендирующие агенты уже описаны выше. Примеры консервантов включают, но без ограничения, например, антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту. Кроме того, диспергируемые порошки и гранулы также могут содержать по меньшей мере одно вспомогательное вещество, включая, но без ограничения, например, подсластители; ароматизаторы; и красители.

Эмульсия по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений с 1 по 34, и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли, может быть изготовлена, например, в виде эмульсии масло-в-воде. Масляная фаза эмульсий, содержащих соединения формулы (I) или (II), такие как соединение, выбранное из соединений 1-34, может быть составлена из известных ингредиентов известным способом. Масляная фаза может быть обеспечена, например, но без ограничения, растительным маслом, таким как, например, оливковое масло и арахисовое масло; минеральным маслом, таким как, например, жидкий парафин; и их смесями. Хотя эта фаза может содержать исключительно эмульгатор, она может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом, либо и с жиром, и с маслом. Подходящие эмульгаторы включают, например, но без ограничения, фосфатиды природного происхождения, например, соевый лецитин; сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гекситола, такие как, например, моноолеат сорбитана; и продукты конденсации неполных сложных эфиров с этиленоксидом, такие как, например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. Предпочтительно гидрофильный эмульгатор включают вместе с липофильным эмульгатором, который действует как стабилизатор. Также предпочтительно включать как масло, так и жир. Вместе эмульгатор(ы) со стабилизатором(ами) или без него образуют так называемый эмульгирующий воск, и этот воск вместе с маслом и жиром

образует так называемую эмульгирующую масляную основу, которая образует масляную дисперсную фазу препаратов в виде крема. Эмульсия может также содержать подсластитель, ароматизатор, консервант и/или антиоксидант. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для использования в составе для применения в методах лечения, включают Tween 60, Span 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат, лаурилсульфат натрия, глицерилдистеарат отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области.

Соединения, например соединения формулы (I) или (II), такие как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль, также можно вводить, например, внутривенно, подкожно, и/или внутримышечно в любой фармацевтически приемлемой и подходящей форме для инъекций. Примеры инъекционных форм включают, например, но без ограничения, стерильные водные растворы, содержащие приемлемые носители и растворители, такие как, например, вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия; стерильные микроэмульсии масло-в-воде; и водные или масляные суспензии.

Составы для парентерального введения могут быть в форме водных или неводных изотонических стерильных инъекционных растворов или суспензий. Эти растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков или гранул с использованием одного или нескольких носителей или разбавителей, упомянутых для применения в препаратах для перорального введения, или с использованием других подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Соединения могут быть растворены в воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, этаноле, кукурузном масле, хлопковом масле, арахисовом масле, кунжутном масле, бензиловом спирте, хлориде натрия, трагакантовой камеди и/или различных буферах. Другие адъюванты и способы введения хорошо и широко известны в области фармацевтики. Активный ингредиент также можно вводить путем инъекции в виде композиции с подходящими носителями, включая физиологический раствор, декстрозу или воду, или с циклодекстрином (например, каптизолом), солюбилизацией соразтворителем (например, пропиленгликолем) или мицеллярной солюбилизацией (например, Tween 80).

Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В число приемлемых носителей и растворителей, которые можно

использовать, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при приготовлении инъекционных препаратов.

Стерильная микроэмульсия масло-в-воде для инъекций может быть приготовлена, например, путем 1) растворения по меньшей мере одного соединения, например, соединения формулы (I) или (II), такого как соединение, выбранное из соединений 1-34, и/или его фармацевтически приемлемой соли, в масляной фазе, такой как, например, смесь соевого масла и лецитина; 2) объединения соединения, например, соединения формулы (I), и/или его фармацевтически приемлемой соли, содержащего масляную фазу, со смесью воды и глицерина; и 3) обработку комбинации с образованием микроэмульсии.

Стерильная водная или масляная суспензия может быть приготовлена в соответствии со способами, уже известными в данной области. Например, стерильный водный раствор или суспензия могут быть приготовлены с нетоксичным парентерально приемлемым разбавителем или растворителем, таким как, например, 1,3-бутандиол; и стерильная маслянистая суспензия может быть приготовлена со стерильным нетоксичным приемлемым растворителем или суспендирующей средой, такой как, например, стерильные нелетучие масла, например, синтетические моно- или диглицериды; и жирные кислоты, такие как, например, олеиновая кислота.

Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и наполнители, которые можно использовать в фармацевтических композициях, включают, но без ограничения, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарственных средств (SEDDS), такие как d-альфа-токоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических лекарственных формах, такие как Tweens, полиэтиоксилированное касторовое масло, такое как поверхностно-активное вещество CREMOPHOR (BASF), или другие подобные полимерные матрицы для доставки, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка,

коллоидный кремнезем, трисиликат магния, поливинилпирролидон, целлюлозавещества на основе, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин. Циклодекстрины, такие как альфа-, бета- и гамма-циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксилалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропилциклодекстрины, или другие солюбилизованные производные, также могут быть успешно использованы для улучшения доставки соединений, имеющих формулы, описанные в настоящем документе.

Описанные в настоящем документе фармацевтически активные соединения могут быть обработаны в соответствии с обычными способами фармации для получения лекарственных средств для введения пациентам, включая людей и других млекопитающих. Фармацевтические композиции могут быть подвергнуты обычным фармацевтическим операциям, таким как стерилизация, и/или могут содержать обычные адъюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, буферы и т.д. Таблетки и пилюли могут быть дополнительно изготовлены с энтеросолюбильным покрытием. Такие композиции могут также содержать адъюванты, такие как смачивающие, подслащивающие, ароматизирующие и ароматизирующие агенты.

Количества вводимых соединений и режим дозирования для лечения болезненного состояния с помощью соединений и/или композиций, описанных в настоящем документе, зависит от множества факторов, включая возраст, массу тела, пол, состояние здоровья субъекта, тип заболевания, тяжесть заболевания, способ и частоту введения, и конкретное используемое соединение. Таким образом, режим дозирования может варьироваться в широких пределах, но его можно определить рутинно с использованием стандартных методов. Подходящей может быть суточная доза от примерно 0,001 до 100 мг/кг массы тела, предпочтительно от примерно 0,0025 до примерно 50 мг/кг массы тела и наиболее предпочтительно от примерно 0,005 до 10 мг/кг массы тела. Суточную дозу можно вводить от одной до четырех доз в день. Другие схемы дозирования включают одну дозу в неделю и одну дозу в двухдневный цикл.

Для терапевтических целей описанные в настоящем документе активные соединения обычно комбинируют с одним или несколькими адъювантами, подходящими для указанного пути введения. При пероральном введении соединения

могут быть смешаны с лактозой, сахарозой, крахмальным порошком, эфирами целлюлозы и алкановых кислот, алкиловыми эфирами целлюлозы, тальком, стеариновой кислотой, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислот, желатином, аравийской камедью, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом, а затем таблетированы или инкапсулированы для удобного введения. Такие капсулы или таблетки могут содержать состав с контролируемым высвобождением, который может быть представлен в виде дисперсии активного соединения в гидроксипропилметилцеллюлозе.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одно соединение, например, соединение формулы (I), и/или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль, и необязательно дополнительный агент, выбранный из любого фармацевтически приемлемого носителя, адъюванта и наполнителя. Альтернативные композиции, описанные в настоящем документе, содержат соединение, такое как соединение формулы (I) или (II), такое как соединение, выбранное из соединений 1-34, описанных в настоящем документе, или его пролекарство, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело, используемое в способах лечения, описанных в настоящем документе, вводят в дозе в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20,0 мг/кг массы тела, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 12 мг/кг, примерно 13 мг/кг, примерно 14 мг/кг, примерно 15 мг/кг, примерно 16 мг/кг, примерно 17 мг/кг, примерно 18 мг/кг, примерно 19 мг/кг или примерно 20 мг/кг, примерно один раз в 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель.

В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в дозе примерно 15 мг/кг массы тела примерно один раз каждые 3 недели. В других аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в дозе примерно 10 мг/кг массы тела примерно один раз каждые 2 недели.

В других аспектах анти-PD-L1 антитело, подходящее для настоящего изобретения, представляет собой фиксированную дозу. В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в виде фиксированной дозы от примерно 200 мг до примерно 1600 мг, от примерно 200 мг до примерно 1500 мг, от примерно 200 мг до примерно 1400 мг,

от примерно 200 мг до примерно 1300 мг, от примерно 200 мг до примерно 1200 мг, от примерно 200 мг до примерно 1100 мг, от примерно 200 мг до примерно 1000 мг, от примерно 200 мг до примерно 900 мг, от примерно 200 мг до примерно 800 мг, от примерно 200 мг до примерно 700 мг, примерно от 200 мг до примерно 600 мг, от примерно 700 мг до примерно 1300 мг, от примерно 800 мг до примерно 1200 мг, от примерно 700 мг до примерно 900 мг или от примерно 1100 мг до примерно 1300 мг. В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в виде фиксированной дозы по меньшей мере примерно 240 мг, по меньшей мере примерно 300 мг, по меньшей мере примерно 320 мг, по меньшей мере примерно 400 мг, по меньшей мере примерно 480 мг, по меньшей мере примерно 500 мг, по меньшей мере примерно 560 мг, по меньшей мере примерно 600 мг, по меньшей мере примерно 640 мг, по меньшей мере примерно 700 мг, по меньшей мере примерно 720 мг, по меньшей мере примерно 800 мг, по крайней мере меньшей 840 мг, по меньшей мере примерно 880 мг, по меньшей мере примерно 900 мг, по меньшей мере примерно 960 мг, по меньшей мере примерно 1000 мг, по меньшей мере примерно 1040 мг, по меньшей мере примерно 1100 мг, по меньшей мере примерно 1120 мг, по меньшей мере примерно 1200 мг, по меньшей мере примерно 1280 мг, по меньшей мере примерно 1300 мг, по меньшей мере примерно 1360 мг или по меньшей мере примерно 1400 мг с интервалом дозирования примерно 1, 2, 3 или 4 недели. В некоторых аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в виде фиксированной дозы примерно 1200 мг примерно один раз каждые 3 недели. В других аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в виде фиксированной дозы примерно 800 мг примерно один раз каждые 2 недели. В других аспектах анти-PD-L1 антитело вводят в виде фиксированной дозы примерно 840 мг примерно один раз каждые 2 недели.

В некоторых аспектах атезолизумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 1200 мг один раз примерно каждые 3 недели. В некоторых аспектах атезолизумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 800 мг один раз примерно каждые 2 недели. В некоторых аспектах атезолизумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 840 мг один раз примерно каждые 2 недели.

В некоторых аспектах авелумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 800 мг один раз примерно каждые 2 недели. В некоторых аспектах дурвалумаб вводят в дозе около 10 мг/кг один раз примерно каждые 2 недели. В некоторых аспектах дурвалумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 800 мг/кг один раз примерно

каждые 2 недели. В некоторых аспектах дурвалумаб вводят в виде фиксированной дозы примерно 1200 мг/кг один раз примерно каждые 3 недели.

В некоторых аспектах анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, используемые в способах лечения, описанных в настоящем документе, вводят в дозе в диапазоне от 0,1 мг/кг до 10,0 мг/кг массы тела один раз каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В некоторых аспектах анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг или 3 мг/кг массы тела один раз каждые 3, 4, 5 или 6 недель. В одном аспекте анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 3 мг/кг массы тела один раз каждые 2 недели. В другом аспекте анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг массы тела один раз каждые 6 недель.

В некоторых аспектах анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде фиксированной дозы. В некоторых аспектах анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе от примерно 10 до примерно 1000 мг, от примерно 10 мг до примерно 900 мг, от примерно 10 мг до примерно 800 мг, от примерно 10 мг до примерно 700 мг, от примерно 10 мг до примерно 600 мг, от примерно 10 мг до примерно 500 мг, от примерно 100 мг до примерно 1000 мг, от примерно 100 мг до примерно 900 мг, от примерно 100 мг до примерно 800 мг, от примерно от 100 мг до примерно 700 мг, от примерно 100 мг до примерно 100 мг, от примерно 100 мг до примерно 500 мг, от примерно 100 мг до примерно 480 мг или от примерно 240 мг до примерно 480 мг. В одном аспекте анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде фиксированной дозы по меньшей мере примерно 60 мг, по меньшей мере примерно 80 мг, по меньшей мере примерно 100 мг, по меньшей мере примерно 120 мг, по меньшей мере примерно 140 мг, по меньшей мере примерно 160 мг, по меньшей мере примерно 180 мг, по меньшей мере примерно 200 мг, по меньшей мере примерно 220 мг, по меньшей мере примерно 240 мг, по меньшей мере примерно 260 мг, по меньшей мере примерно 280 мг, по меньшей мере примерно 300 мг, по меньшей мере примерно 320 мг, по меньшей мере примерно 340 мг, по меньшей мере примерно 360 мг, по меньшей мере примерно 380 мг, по меньшей мере примерно 400 мг, по меньшей мере примерно 420 мг, по меньшей мере примерно 440 мг, по меньшей мере примерно 460 мг, по меньшей мере примерно 480 мг, по меньшей мере примерно 500 мг, по меньшей мере примерно 520 мг, по меньшей мере примерно 540 мг, по меньшей мере примерно 550 мг, по меньшей мере примерно 560 мг, по меньшей мере примерно 580 мг, по меньшей мере примерно 600 мг, по

меньшей мере примерно 620 мг, по меньшей мере примерно 640 мг, по меньшей мере примерно 660 мг, по меньшей мере примерно 680 мг, по меньшей мере примерно 700 мг или по меньшей мере примерно 720 мг. В другом аспекте анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающую часть вводят в виде фиксированной дозы примерно один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель.

В некоторых аспектах ипилимумаб вводят в дозе примерно 3 мг/кг один раз примерно каждые 3 недели. В некоторых аспектах ипилимумаб вводят в дозе примерно 10 мг/кг один раз примерно каждые 3 недели. В некоторых аспектах ипилимумаб вводят в дозе примерно 10 мг/кг один раз примерно каждые 12 недель. В некоторых аспектах ипилимумаб вводят в четырех дозах.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы многими способами, доступными специалистам в области органической химии. Общие синтетические схемы получения, охватываемые настоящим документом, описаны ниже. Эти схемы являются иллюстративными и не предназначены для ограничения возможных методов, которые может использовать специалист в данной области для получения соединений, описанных в настоящем документе. Специалистам в данной области будут очевидны различные способы получения соединений, охватываемых настоящим документом. Примеры соединений, полученных способами, описанными на общих схемах, представлены в разделе «Примеры», приведенном ниже. Получение гомохиральных соединений в примерах можно осуществить методами, известными специалисту в данной области. Например, гомохиральные соединения могут быть получены разделением рацемических продуктов или диастереомеров с помощью препаративной HPLC с хиральной фазой. Альтернативно, иллюстративные соединения могут быть получены с помощью способов, известных для получения энантимерно или диастереомерно обогащенных продуктов.

Реакции и методики, описанные в этом разделе, выполняются в растворителях, соответствующих применяемым реагентам и материалам, и пригодных для осуществляемых превращений. Кроме того, следует понимать, что в описании представленных ниже методов синтеза все предлагаемые условия реакций, включая выбор растворителя, реакционную атмосферу, температуру реакции, длительность эксперимента и процедуру его проведения, выбираются как условия, стандартные для данной реакции, которые должны быть понятными специалистам в данной области. Специалистам в области органического синтеза очевидно, что присутствующие в

различных частях молекулы функциональные группы должны быть совместимы с предлагаемыми реагентами и реакциями. Такие ограничения в отношении заместителей, которые совместимы с условиями реакции, вполне очевидны для специалистов в данной области, при этом требуются альтернативные варианты, когда присутствуют несовместимые заместители. Иногда это потребует принять решение об изменении порядка следования стадий синтеза или выборе одной конкретной схемы процесса вместо другой, чтобы получить желаемое соединение. Также будет признано, что еще одним важным соображением при планировании любого пути синтеза в этой области является разумный выбор защитной группы, используемой для защиты реакционноспособных функциональных групп, присутствующих в соединениях, описанных в настоящем документе. Авторитетным отчетом, описывающим множество альтернатив для дипломированного практикующего врача, является Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, Wiley and Sons (2007).

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры иллюстрируют конкретные и предпочтительные варианты осуществления настоящего раскрытия и не ограничивают объем настоящего раскрытия. Химические сокращения и символы, а также научные сокращения и символы имеют свои обычные и общепринятые значения, если не указано иное. В настоящем документе определены дополнительные сокращения, используемые в примерах и других местах данной заявки. Общепринятые промежуточные соединения обычно применяют для получения более чем одного соединения по примерам и обозначают последовательно (например, промежуточное соединение 1, промежуточное соединение 2 и т.д.) и сокращенно Инт. 1 или И1, Инт. 2 или И2 и т.д. В некоторых случаях описаны альтернативные способы получения промежуточных соединений или соединений по примерам. Часто химики, квалифицированные в области синтеза, могут разработать альтернативные препараты, которые могут быть желательны, исходя из одного или нескольких соображений, таких как более короткое время реакции, менее дорогие исходные материалы, простота эксплуатации или выделения, улучшенный выход, возможность катализа, отсутствие токсичных реагентов, доступность специализированного инструментария и уменьшенное количество линейных стадий и т.д. Целью описания альтернативных препаратов является дальнейшее обеспечение возможности получения соединений по примерам в настоящем раскрытии. В некоторых случаях некоторые функциональные группы в представленных примерах и

формуле изобретения могут быть заменены хорошо известными биоизостерическими заменами, известными в данной области, например, заменой карбоксильной группы на тетразольный или фосфатный фрагмент. Данные ^1H ЯМР, собранные в дейтерированном диметилсульфоксиде, использовали подавление сигнала воды при обработке данных. Сообщаемые спектры не скорректированы на эффекты подавления сигналов воды. Протоны, соседние с частотой подавления сигналов воды, равной 3,35 ppm, демонстрируют уменьшенную интенсивность сигнала.

СОКРАЩЕНИЯ

Ac	ацетил
anhyd.	безводный
aq.	водный
aza-HOBt	7-аза-1-гидроксибензотриазол
Bn	бензил
1-BOC-piperazine	<i>трет</i> -бутил карбоксилат
Bu	бутил
CV	колоночные объемы
DCE	дихлорэтан
DCM	дихлорметан
DEA	диэтиламин
DIEA	диизопропилэтиламин (основание Хунига)
DIPEA	диизопропилэтиламин
DMA	<i>N,N</i> -диметилацетамид
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
EA	этилацетат

EDC	1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид
Et	этил
h, hours или hrs	час(ы)
HATU	(1-[бис(диметиламино)метиле́н]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b] пиридиний 3-оксид-гексафторфосфат)
HCl	хлористоводородная кислота
HPLC	жидкостная хроматография высокого давления
KHMDS	калия бис(триметилсилил)амид
LC	жидкостная хроматография
LCMS	жидкостная хроматография – масс-спектрометрия
M	молярный
mM	миллимолярный
Me	метил
MHz	мегагерц
mins	минута(ы)
M ⁺¹	(M+H) ⁺
MS	масс-спектрометрия
n или N	нормальный
NaHMDS	натрия бис(триметилсилил)амид
NBS	<i>N</i> -бромсукцинимид
nM	наномолярный
NMP	<i>N</i> -метилпирролидон
Ph	фенил
PYBROP	бромтрипирролидинофосфония гексафторфосфат

RuPhos прекатализатор	хлор(2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропокси-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II)
RT или Ret time	время удерживания
sat.	насыщенный
t-BuOH	третичный бутанол
TEA	триэтиламин
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
TLC	тонкослойная хроматография
POCl ₃	оксихлорид фосфора
2 nd Gen Xphos	CAS-номер 1310584-14-5

Пример 1: DGKi усиливает активность ниволумаба и ипилимумаба в анализе аллореактивности с анализа MLR

В этом примере показано, что ингибирование DGK усиливает активность ингибитора PD-1 и CTLA-4, о чем свидетельствует повышенный уровень интерферона-гамма (IFN-гамма), секретируемого в анализе MLR.

Анализ проводили следующим образом. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из цельной крови, обработанной EDTA, с использованием способа разделения клеток в градиенте Фиколла. Клетки далее выделяли до Т-клеток с применением набора для обогащения Т-клетками человека Stemcell EasySep (Stemcell 19051). Ранее приобретенные замороженные моноциты оттаивали и дифференцировали в дендритные клетки (DC) в течение шести дней с обработкой GM-CSF и IL-4 в инкубаторе с CO₂ при 37°C. Т-клетки высевали по 100 тысяч клеток на лунку в 96-луночный круглодонный планшет в среде RPMI с 10% FBS. В соответствующие лунки добавляли аллогенные дендритные клетки в соотношении Т-клетки: незрелые DC 10:1. Ингибитор DGKi, соединение 15, разбавляли в DMSO, а затем дополнительно разбавляли в среде RPMI с 10% FBS и добавляли в соответствующие лунки Т-клетки: незрелые DC до конечной концентрации DMSO 0,1% в конечном объеме 250 мкл. Реакционную смесь смешанной культуры

лимфоцитов помещали в инкубатор на 5 дней. На 5-й день 130 мкл среды удаляли и 10 мкл использовали в анализе IFN-гамма с применением ELISA (BD, номер по каталогу 555142).

Результаты, показанные на фигурах 1А и В, указывают на то, что ингибирование DGK повышает уровень секреции IFN-гамма Т-клетками, обработанными ингибитором PD-1 или CTLA-4.

Пример 2: Ингибирование DGK усиливает объединенную активность антагониста PD-1 и антагониста CTLA4 в животной модели опухоли B16

В этом примере показано, что введение DGKi одновременно с антагонистом PD-1 и антагонистом CTLA4 приводит к повышенной активности в отношении уменьшения размеров опухоли по сравнению с комбинацией антагониста PD-1 и антагониста CTLA4.

Этот анализ проводили на модели опухоли B16 (модель опухоли меланомы человека). Мышам вводили анти-PD-1 антитело (моноклональное антитело mIgG1-D265A, направленное против мышиного PD-1), анти-CTLA4 антитело (моноклональное антитело mIgG2b, направленное против мышиного CTLA4), только носитель и/или DGKi, и измеряли рост опухоли. Результаты, показанные на фигурах 2 А-Г, указывают на то, что при применении индивидуальных агентов или комбинации двух агентов не наблюдалось значительного уменьшения размеров опухоли, но сочетание DGKi с анти-PD-1 антителом и анти-CTLA4 антителом приводило к уменьшению размеров опухоли (фигура 2Г).

Пример 3: Ингибирование DGK усиливает активность ингибитора PD-1 и/или ингибитора CTLA-4 в животной модели опухоли CT26

В этом примере показано, что в модели CT26 введение ингибитора DGK усиливает уменьшение размеров опухоли, индуцированное анти-PD-1 и/или анти-CTLA4 антителом.

Анализ проводили следующим образом: клетки CT26 (клеточная линия мышинной колоректальной карциномы из ATCC) культивировали в 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) и среде RPMI 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific). Самки мышей BALB/c, полученные от Envigo, прибыли в возрасте 6-8 недель. Для имплантации опухоли (день 0) мышам в правый бок вводили путем подкожной инъекции 0,1 мл клеточной суспензии CT26 в концентрации 1×10^7

клеток/мл. Когда опухоли вырастали до заданного объема $\sim 100 \text{ мм}^3$, обычно примерно через 10 дней после имплантации, мышей рандомизировали и распределяли на различные контрольные и лечебные группы, после чего начинали дозирование. DGKi Соединение 16 составляли в 90% PEG400, 5% этанола и 5% TPGS, и вводили перорально в объеме 10 мл/кг массы тела. Анти-CTLA4 (анти-mCTLA4, mIgG2b) и анти-PD1 (моноклональное антитело mIgG1-D265A, направленное против мышинового PD-1) и изотипические контроли разводили DPBS до дозы 10 мг/кг. Терапию антителами проводили путем внутривентральной инъекции (I.P.) каждые 4 дня, в общей сложности 3 дозы (Q4Dx3). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля до тех пор, пока опухоли полностью не регрессировали (0 мм^3) или не достигали 1000 мм^3 и не подвергались эвтаназии. Для окрашивания тетрамером AH1 от каждой мыши отбирали 100 мкл крови в пробирку с литий-гепарином. Кровь окрашивали тетрамером AH1 (MBL), анти-Cd3, анти-cd4 и анти-Cd8 (Biolegend). Образцы лизировали с использованием буфера Lyse/Fix (BD), образцы измеряли на цитометре CantoX (BD) и анализировали в программе FlowJo (BD).

Результаты, показанные на фигуре 3А-Н, указывают на то, что DGKi усиливает уменьшение объема опухоли, индуцированное (i) ингибитором PD1; (ii) ингибитором CTLA-4; и (iii) ингибитором PD1 и ингибитором CTLA-4, в мышинной модели CT26. Результаты, показанные на фигуре 3I, указывают на то, что DGKi увеличивает процентное содержание клеток CD8, которые являются позитивными на опухолевый антиген AH1 + Тетрамер. Таким образом, комбинированное лечение приводит к улучшению полных ответов и коррелирует с увеличением AH1+ Т-клеток в модели CT26. Комбинация ингибитора DGK как с антагонистом CTLA4, так и с антагонистом PD1 приводила к наибольшему количеству полных ответов, т.е. 10 из 10 полных ответов.

Пример 4. Ингибирование DGK снижает пороговый уровень антигена, необходимый для активации TCR

В этом примере показано, что ингибирование DGK (1) потенцирует Т-клеточный ответ, индуцированный слабыми опухолевыми антигенами, и (2) снижает концентрацию опухолевого антигена, необходимую для активации Т-клеток.

Этот анализ проводили следующим образом: Клетки MC38 (клетки аденокарциномы толстой кишки мышей) приобретали и культивировали в 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) и среде RPMI

1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific). Варианты Ova и гетероклитического пептида приобретали у AnaSpec и ресуспендировали в соответствии с протоколом производителя. Клетки MC38 сенсibilizировали 1 мкг/мл пептида или указанной концентрацией в течение 3 часов, после чего свободный пептид вымывали. Мыши OT1 (которые являются трансгенными по TCR, рестриктированному по молекуле MHC класса I/C57B16 фон, при этом TCR является специфическим в отношении овальбумина (OVA (SIINFEKL) или следующих производных пептида OVA: A2 (SAINFEKL), Q4 (SIIQFEKL), T4 (SIITFEKL), Q4H7 (SIIQFEHL), но не распознает скремблированный пептид FILKSINE), были приобретены у Jackson Labs. В таблице ниже показана аффинность связывания TCR с этими пептидами. Т-клетки CD8 очищали от тотальных спленоцитов (StemCell) мышей OT1 и активировали, используя CD3/CD28-шарики (Invitrogen), а затем замораживали. Замороженные активированные CD8 Т-клетки OT-1 оттаивали во время сенсibilизации пептидом и высевали с соединением 15 DGKi или контрольным соединением, или DMSO на 1 час. Клетки, сенсibilизированные белком MC38, вносили в планшет и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты собирали и уровень IL-2 измеряли с помощью AlphaLISA (PerkinElmer).

Пептид	Последовательность	K _d (мкМ)
OVA	SIINFEKL	1
A2	SAINFEKL	4
Q4	SIIQFEKL	36
T4	SIITFEKL	122
Q4H7	SIIQFEHL	167
Скремблированный	FILKSINE	Не имеет значения

Результаты, показанные на фигурах 4A-F, указывают на то, что соединение 15 DGKi снижает как требование к аффинности, так и требование к концентрации антигена для распознавания и активации Т-клеточного антигена.

Пример 5. Ингибирование DGK повышает эффекторную функцию CTL человека и усиливает уничтожение опухолевых клеток

В этом примере показано, что ингибирование DGK увеличивает эффекторную функцию CTL и уничтожение опухолевых клеток.

Анализ проводили следующим образом: Клетки HCT116-GFP (колоректальный рак человека) приобретали у Cellomics. HCT116-GFP сенсibilизировали пептидами A2 и B35 (Astarte) в указанных концентрациях в течение 1 часа с последующим отмыванием. Клетки высевали и оставляли для адгезии на ночь. CMV-специфические человеческие CD8 Т-клетки (Astarte) оттаивали, обрабатывали соединением 15 DGKi в течение 1 часа, затем добавляли к клеткам HCT116-GFP. Через 24 часа после совместного культивирования собирали супернатант и измеряли IFNg с помощью AlphaLISA (PerkinElmer). Изображения GFP получали с использованием флуоресцентного микроскопа.

Результаты, показанные на фигурах 5А и В демонстрируют, что соединение 15 DGKi повышает эффекторную функцию CTL человека и усиливает уничтожение опухолевых клеток.

Пример 6: Ингибирование DGK может преодолеть снижение уровней В2М для восстановления эффекторной функции Т-клеток

Многие опухоли человека имеют мутации, которые приводят к частичной или полной утрате молекул МНС класса I, что имеет решающее значение для распознавания и уничтожения Т-клетками опухолевых клеток. Этот пример демонстрирует, что ингибирование DGK позволяет Т-клеткам распознавать опухолевые клетки, которые имеют более низкие уровни МНС. В противном случае эти клетки-мишени не распознавались бы Т-клетками.

Анализ проводили следующим образом: HCT116-GFP приобретали у Cellomics и культивировали в 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) и среде RPMI 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific). Направляющую РНК В2М (Synthego) вводили в клетки HCT116-GFP путем нуклеофекции (Lonza). После извлечения клетки высевали в индивидуальные лунки для генерирования клонов отдельных клеток. Клоны окрашивали на В2М (Biolegend) и оценивали с помощью проточной цитометрии. Затем клоны сенсibilизировали пептидами A2 или B35 (Astarte) в концентрации 1 мг/мл в течение 1 часа с последующим отмыванием. Клетки высевали и оставляли для адгезии на ночь. CMV-специфические CD8 Т-клетки человека (Astarte) оттаивали, обрабатывали соединением 15 DGKi в течение 1 часа и

затем добавляли к клеткам HCT116. Через 24 часа после совместного культивирования собирали супернатант и измеряли IFN-гамма, используя AlphaLISA (PerkinElmer).

Результаты, показанные на фигурах 6А и В, указывают на то, что соединение 15 DGKi повышает уровни IFN-гамма от Т-клеток, распознающих опухолевые клетки, имеющие пониженное содержание антигенов МНС класса I.

Пример 7: Лечебное воздействие на опухоль за счет ингибирования DGK и антагониста PD1 зависит от CD8+ Т-клеток

В этом примере показано, что лечебное воздействие на опухоль зависит от CD8+ Т-клеток в животной модели CT26.

Анализ проводили следующим образом: Клетки CT26 (из ATCC) культивировали в 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) и среде RPMI 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific). Самки мышей BALB/c, полученные от Envigo, прибыли в возрасте 6-8 недель. Для имплантации опухоли (день 0) мышам в правый бок вводили путем подкожной инъекции 0,1 мл клеточной суспензии CT26 в концентрации 1×10^7 клеток/мл. Антитело, истощающее CD8 (2.43, BioXCell), разводили в PBS и вводили в дозе 100 мкг/мышь. Дозирование начинали в 1-й день и продолжали каждые 3-4 дня до завершения исследования. Когда опухоли вырастали до заданного объема $\sim 100 \text{ мм}^3$, обычно примерно через 10 дней после имплантации, мышей рандомизировали и распределяли на различные контрольные и лечебные группы, после чего начинали дозирование. Соединение 16 DGKi составляли в 90% PEG400, 5% этаноле и 5% TPGS, и вводили перорально в объеме 10 мл/кг массы тела каждые 3 дня, в общей сложности 5 доз (Q3Dx5) при 5 мг/кг. Анти-PD1 антитело (моноклональное антитело mIgG1-D265A, направленное против мышинного PD-1) и изотипический контроль разбавляли DPBS до дозы 10 мг/кг. Терапию антителами проводили путем внутрибрюшинной инъекции (I.P.) каждые 4 дня, в общей сложности 3 дозы (Q4Dx3). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля до тех пор, пока опухоли полностью не регрессировали (0 мм^3) или не достигали 1000 мм^3 и не подвергались эвтаназии.

Результаты, показанные на фигуре 7, указывают на то, что уменьшение объема опухолей, полученное при лечении мышей CT26 анти-PD-1 антагонистом и соединением 16 DGKi, сокращается за счет истощения CD8+ клеток.

Пример 8: Уменьшение объема опухоли за счет ингибирования DGK и антагониста PD1 усиливается за счет истощения клеток CD4

В этом примере продемонстрировано, что уменьшение размеров опухоли, достигаемое с помощью комбинации ингибитора DGK и антагониста PD-1, дополнительно усиливается за счет истощения клеток CD4.

Анализ проводили следующим образом: клетки CT26 (из ATCC) культивировали в 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) и среде RPMI 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific). Самки мышей BALB/c, полученные от Envigo, прибыли в возрасте 6-8 недель. Для имплантации опухоли (день 0) мышам в правый бок вводили путем подкожной инъекции 0,1 мл клеточной суспензии CT26 в концентрации 1×10^7 клеток/мл. Антитело, истощающее CD4 (GK1.5, BioXCell), разводили в PBS и вводили в дозе 100 мкг/мышь. Дозирование начинали в 1-й день и продолжали каждые 3-4 дня до завершения исследования. Когда опухоли вырастали до заданного объема $\sim 100 \text{ мм}^3$, обычно примерно через 10 дней после имплантации, мышей рандомизировали и распределяли на различные контрольные и лечебные группы, после чего начинали дозирование. Соединение 16 DGKi составляли в 90% PEG400, 5% этанола и 5% TPGS, и вводилось перорально в объеме 10 мл/кг массы тела каждые 3 дня, в общей сложности 5 доз (Q3Dx5) при 5 мг/кг. Анти-PD1 (моноклональное антитело mIgG1-D265A, направленное против мышинового PD-1) и изотипический контроль (MOPC-21, BioXCell) разводили DPBS до дозы 10 мг/кг. Терапию антителами проводили путем внутрибрюшинной инъекции (I.P.) каждые 4 дня, в общей сложности 3 дозы (Q4Dx3). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля до тех пор, пока опухоли полностью не регрессировали (0 мм^3) или не достигали 1000 мм^3 и не подвергались эвтаназии.

Результаты, показанные на фигуре 8, указывают на то, что уменьшение объема опухоли, полученное путем лечения мышей MC38 анти-PD-1 антагонистом и соединением 16 DGKi, усиливается за счет истощения клеток CD4+, предположительно вследствие истощения клеток Treg.

Пример 9: NK-клетки необходимы для противоопухолевой эффективности DGKi и анти-PD1

В этом примере показано, что активность в отношении уменьшения опухоли, индуцированная DGKi и антагонистом PD1, зависит от NK-клеток в животной модели CT26.

Анализ проводили в основном так же, как описано в примерах 6 и 7, но вместо добавления антитела, связывающегося с CD4 или CD8, вводили anti-asialo-GM1 (Life Technologies) в дозе 50 мкг/мышь, начиная с дня 4 после инъекции опухоли и продолжали каждые 7 дней до окончания исследования.

Результаты, показанные на фигуре 9, указывают на то, что NK-клетки вносят вклад в противоопухолевую активность соединения 16 DGKi в комбинации с ингибитором PD1 на мышинной модели CT26.

Пример 10: Комбинация DGKi формулы II либо с анти-PD-1, либо с анти-CTLA4 проявляет надежную эффективность

В этом примере показано, что иллюстративная DGKi формулы II из группы соединений 17-34 вместе с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителом обладает сильной противоопухолевой активностью в животной модели MC38.

Анализ проводили следующим образом. Линию опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки мыши MC38 поддерживали в 10% фетальной бычьей сыворотке (FBS, Invitrogen) и среде 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco) в колбах T75. Клетки выращивали до субконфлюэнтности и пассировали два раза в неделю, просто промывая DPBS (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко, Gibco), позволяя клеткам оседать несколько минут и постукивая по колбе. Соотношение пассажей клеток MC38 варьировалось от 1:16 до 1:20 в зависимости от времени и конфлюэнтности. Для имплантации *in vivo* клетки промывали DPBS, а затем собирали в ледяном HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка, Gibco) в конических пробирках объемом 50 мл на льду. Пробирки вращали со скоростью 1300 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость осторожно удаляли, и клеточные осадки промывали HBSS и снова вращали. Клеточные осадки ресуспендировали в приблизительных имплантируемых объемах HBSS. Концентрацию клеток измеряли с помощью Moxi-Z (Orflo) и доводили до конечной концентрации с помощью HBSS. Жизнеспособность клеток измеряли методом исключения трипанового синего на Countess II (Life Technologies). Самок мышей C57Bl/6 получали от Charles River Laboratories (Kingston, NY) в возрасте 6-8 недель и акклиматизировали в течение 3-7 дней. Во время имплантации опухоли (день 0) мышам вводили подкожно 0,1 мл клеток MC38 в концентрации $8,5 \times 10^6$ клеток/мл с помощью туберкулинового шприца на 1 мл с иглой 25 калибра, которые имплантировали в левый и в правый бок. Опухоли вырастали до заранее определенного размера, ~78 мм, в это время животных

рандомизировали в разные лечебные и контрольные группы со сходными значениями средних и медианных размеров опухолей, где $n=10$ на группу на 6-й день (дни после имплантации). Лечение начинали на 7-й день (дни после имплантации), когда размер опухолей составлял $\sim 100 \text{ мм}^3$. DGKi формулы II из группы соединений 17-34 составляли в 90% PEG400, 5% этаноле и 5% TPGS, и вводили перорально в объеме 10 мл/кг массы тела каждый день, в общей сложности 28 доз (QDx28) при 0,3 мг/кг. Анти-PD-1 (моноклональное антитело mIgG1-D265A, направленное против мышиного PD-1), анти-CTLA4 (моноклональное антитело mIgG2b, направленное против мышиного CTLA4) и соответствующие изотипические контроли (InVivoPlus Mouse IgG1, клон MOPC-21 и InVivoMab Mouse IgG2b, клон MPC-11 (оба от Bio X Cell (West Lebanon, NH), изотипические контроли для анти-PD-1 и анти-CTLA4, соответственно) разбавляли DPBS до дозы 10 мг/кг. Терапию антителами проводили путем внутрибрюшинной инъекции (I.P.), каждые 4 дня, в общей сложности 3 дозы (Q4Dx3). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля до полной регрессии опухолей (0 мм^3) или достижения 1000 мм^3 и эвтаназии.

Результаты, показанные на фигуре 10, указывают на то, что взятые в отдельности агенты проявляют умеренную эффективность (фигура 10 B-D), но что комбинации DGKi с анти-PD-1 или анти-CTLA4 антителами проявляют сильную противоопухолевую активность (фигура 10 E и F, соответственно).

Пример 11: Комбинация соединения формулы II с анти-PD-1 антителом демонстрирует сильную противоопухолевую эффективность и устойчивую иммунологическую память в обеих животных моделях MC38 и CT26

В этом примере показано, что иллюстративная DGKi формулы II из группы соединений 17-34 вместе с анти-PD-1 обладает сильной противоопухолевой эффективностью, которая может вызывать полную регрессию опухоли и устойчивую иммунологическую память в обеих животных моделях MC38 и CT26.

Исследование проводили следующим образом. Исследование на животной модели MC38 проводили, как описано в примере 10. Исследование на CT26 проводили, как проиллюстрировано в примере 3. DGKi и анти-PD-1 (такие же, как в примере 10) получали и вводили, как в примере 10. Излеченные животные в результате первоначальной парадигмы лечения были оставлены после того, как изменение объема опухоли находилось в стагнации в течение $10 \times \text{TVDT}$ ($10 \times 4,2 \text{ дня} = 42 \text{ дня}$). Этим животным подкожно имплантировали в правый бок клетки с концентрацией, в 10 раз

больше первоначальной. Этих животных измеряли два раза в неделю в течение еще одного периода в 42+ дней для оценки ответа Т-клеток памяти.

Результаты, представленные на фигуре 11 А-Н, указывают на то, что комбинация DGKi формулы II с анти-PD-1 антителом приводит к сильному противоопухолевому эффекту в тестируемых животных моделях. Кроме того, повторное заражение опухолевыми клетками в моделях MC38 и CT26 привело к 100% отторжению трансплантированных клеток (фигуры 11 D и H).

Пример 12: Комбинация соединения формулы II с анти-PD-1 и анти-CTLA4 обеспечивает более высокую эффективность по сравнению с комбинациями с анти-PD-1 или анти-CTLA4 в животной модели B16F10

В этом примере показано, что тройная комбинация иллюстративной DGKi формулы II из группы соединений 17-34 с анти-PD-1 антителом и анти-CTLA4 антителом создает противоопухолевый эффект, который является более сильным, чем у двойных комбинаций в животной модели B16F10 (меланома/MHCl¹⁰).

Исследование на животных моделях проводили следующим образом. Линию опухолевых клеток меланомы мышей B16F10 поддерживали в 10% фетальной телячьей сыворотке (FBS, Invitrogen) и модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Gibco) в колбах T75. Клетки выращивали до субконфлюэнтности и пассировали два раза в неделю, просто промывая колбу DPBS (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко, Gibco), затем промывая колбу трипсином (0,25% трипсина, Gibco), позволяя клеткам оседать несколько минут и постукивая по колбе. Соотношения пассажей клеток B16F10 варьировалось от 1:18 до 1:20 в зависимости от времени и конфлюэнтности. Для имплантации *in vivo* клетки обрабатывали трипсином, как указано выше, а затем собирали в ледяном HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка, Gibco) в конических пробирках объемом 50 мл на льду. Пробирки вращали со скоростью 1300 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость осторожно удаляли, осадки промывали HBSS и снова вращали. Клеточные осадки ресуспендировали в приблизительных имплантируемых объемах HBSS. Концентрацию клеток измеряли с помощью Moxi-Z (Orflo) и довели до конечной концентрации с помощью HBSS. Жизнеспособность клеток измеряли методом исключения трипанового синего на Countess II (Life Technologies). Самок мышей C57Bl/6 получали от Charles River Laboratories (Kingston, NY) в возрасте 6-8 недель и акклиматизировали в течение 3-7 дней. Во время имплантации опухоли (день 0) мышам вводили подкожно

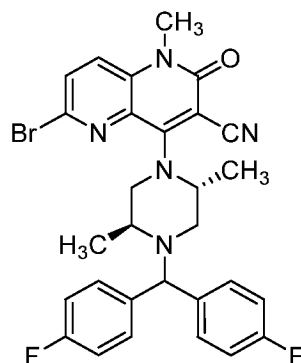
0,1 мл клеток B16.F10 в концентрации 1×10^7 клеток/мл с помощью туберкулинового шприца на 1 мл с иглой 25 калибра, которые имплантировали в правый бок. Лечение начинали, когда опухоли вырастали до заранее определенного размера, $\sim 50 \text{ мм}^3$, и в это время животных рандомизировали в разные лечебные и контрольные группы со сходными значениями средних и медианных размеров опухолей, где $n=10$ на группу на 8-й день (дни после имплантации). DGKi формулы II из группы соединений 17-34 составляли в 90% PEG400, 5% этаноле и 5% TPGS, и вводили перорально в объеме 10 мл/кг массы тела каждый день, в общей сложности 28 доз (QDx28) при 0,3 мг/кг. Анти-PD-1, анти-CTLA4 и соответствующие изотипические контроли (такие же как в примере 10) разбавляли DPBS до дозы 10 мг/кг. Терапию антителами проводили путем внутрибрюшинной инъекции (I.P.), каждые 4 дня, в общей сложности 3 дозы (Q4Dx3). Объемы опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля до полной регрессии опухолей (0 мм^3) или достижения 1000 мм^3 и эвтаназии.

Результаты, представленные на фигуре 12 A-F, указывают на то, что тройная терапия улучшала ответ по сравнению с двойной терапией в животной модели B16F10.

Пример 13: Синтез ингибиторов DGK

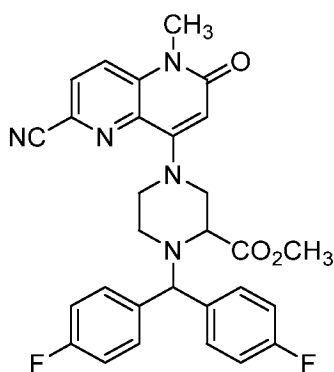
DGKi Соединение 1

4-((2R,5S)-4-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрил



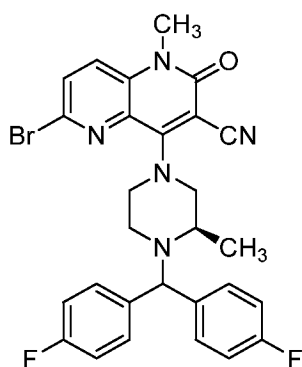
DGKi Соединение 2

Метил-1-(бис(4-фторфенил)метил)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)пиперазин-2-карбоксилат



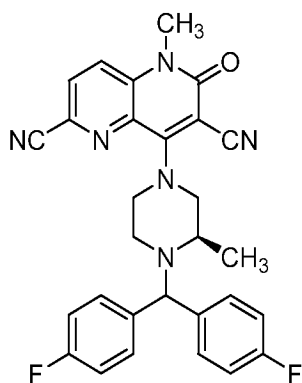
DGKi Соединение 3

(R)-4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрил



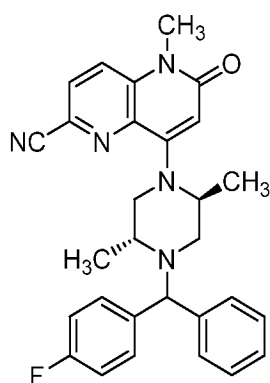
DGKi Соединение 4

(R)-8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2,7-дикарбонитрил



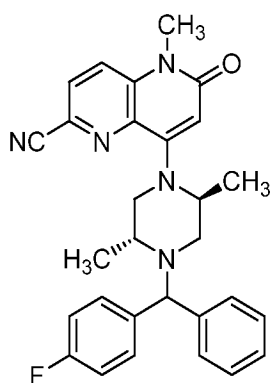
DGKi Соединение 5

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(фенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



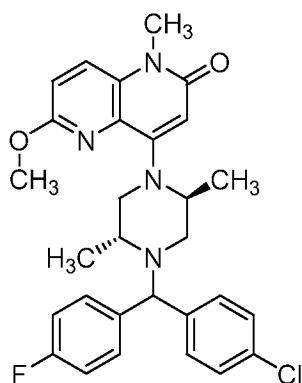
DGKi Соединение 6 и 7

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(фенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



DGKi Соединение 8

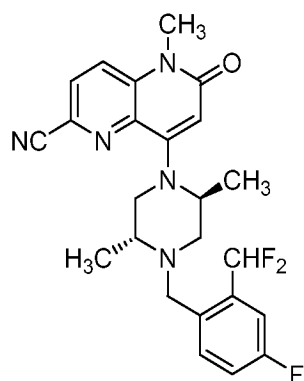
4-[(2S,5R)-4-[(4-хлорфенил)(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-6-метокси-1-метил-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-2-он



DGKi Соединение 9

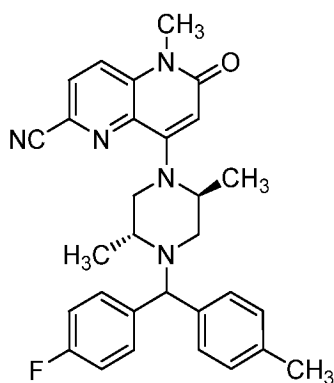
8-[(2S,5R)-4-{[2-(дифторметил)-4-фторфенил]метил}-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-

метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



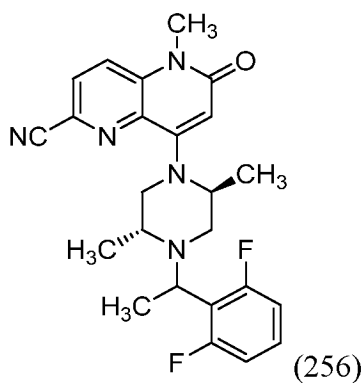
DGKi Соединение 10

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(4-метилфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



DGKi Соединение 11

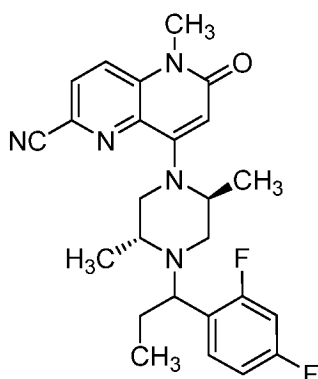
8-[(2S,5R)-4-[1-(2,6-дифторфенил)этил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



DGKi Соединения 12-14

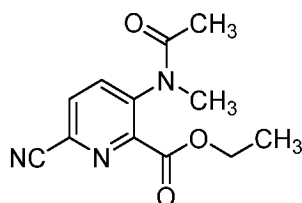
8-((2S,5R)-4-(1-(2,4-дифторфенил)пропил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-

оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



Промежуточное соединение 1

Этил-6-циано-3-(N-метилацетамидо)пиколинат

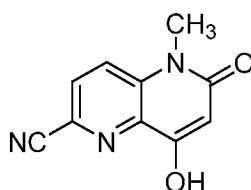


К перемешиваемому бледно-желтому раствору этилового эфира 3-(N-метилацетамидо)-1-(11-оксиданил)-ил-4-пиридин-2-карбоксилата (50 г, 210 ммоль) в DCM (500 мл) при комнатной температуре добавляли триметилсилил цианид (39,4 мл, 294 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин и охлаждали до -10°C . Затем через капельную воронку на 50 мл в течение 15 минут добавляли бензоилхлорид (34,1 мл, 294 ммоль), а затем через капельную воронку на 50 мл медленно в течение 20 минут добавляли TEA (41,0 мл, 294 ммоль). При добавлении TEA наблюдалась экзотермическая реакция. Реакционная смесь превращалась в мутную смесь (соль TEA), которую перемешивали в течение 2,5 ч при той же температуре. Реакцию гасили 10% раствором NaHCO_3 (500 мл) и экстрагировали DCM (3×300 мл). Объединенный органический раствор промывали рассолом (2 x 250 мл), затем сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением неочищенного вещества светло-желтого цвета. Неочищенное вещество очищали на колонке с силикагелем ISCO® RediSep с нормальной фазой с использованием смеси EA/петролейный эфир в качестве элюента. Продукт выделяли, используя смесь 65-70% EA/петролейный эфир, фракции концентрировали с получением этил 6-циано-3-(N-метилацетамидо)пиколината (43 г, выход 83%) в виде светло-коричневой жидкости; LCMS: $m/z = 248.0$ (M+H); время удерживания 1,255 мин; метод LC-MS: Колонка-KINETEX-XB-C18 (75×3 мм, 2,6 мкм);

подвижная фаза А: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (98:2); подвижная фаза В: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (2:98); градиент: 20-100% В в течение 4 минут, скорость потока 1,0 мл/мин, затем удерживание 0,6 минут при 100% В, скорость потока 1,5 мл/мин; затем градиент: 100-20% В в течение 0,1 минуты, скорость потока 1,5 мл/мин.

Промежуточное соединение 2

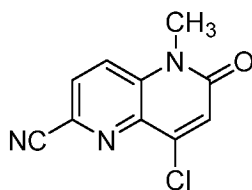
8-гидрокси-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



К перемешиваемому раствору этил 6-циано-3-(N-метилацетида)пиколината (0,9 г, 3,64 ммоль) в тетрагидрофуране (10 мл) добавляли KHMDS (4,80 мл, 4,37 ммоль) при -78°C в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение 30 минут, а затем перемешивали еще 90 минут. Реакционную смесь охлаждали до 0°C. Реакцию гасили насыщенным раствором бикарбоната натрия (70 мл). Смесь разбавляли этилацетатом (2×100 мл). Водный слой собирали и подкисляли 1,5 N HCl, чтобы довести pH до ~3,0. Смесь перемешивали в течение 15 мин до образования массы твердого вещества, которую фильтровали через воронку Бюхнера с получением 8-гидрокси-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, 550 мг, выход 75%) в виде коричневого твердого вещества. LCMS: m/z = 202,0 (M+H); время удерживания 0,361 мин; Метод LC-MS: Колонка-KINETEX-XB-C18 (75×3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (98:2); подвижная фаза В: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (2:98); градиент: 20-100% В в течение 4 минут, скорость потока 1,0 мл/мин, затем удерживание 0,6 минут при 100% В, скорость потока 1,5 мл/мин; затем градиент: 100-20% В в течение 0,1 минуты, скорость потока 1,5 мл/мин.

Промежуточное соединение 3

8-Хлор-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил

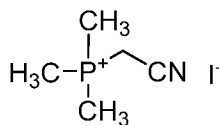


К перемешиваемому раствору 8-гидрокси-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (0,55 г, 2,73 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавляли POCl_3 (1,53 мл, 16,4 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 85°C в течение 5 минут и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Реакционную смесь охлаждали до 0°C . Реакцию гасили насыщенным раствором бикарбоната натрия (50 мл). Реакционную смесь разбавляли DCM (3×100 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением 8-хлор-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (0,25 г, выход 29,1%) в виде коричневого твердого вещества. LCMS: $m/z = 220,2$ ($\text{M}+\text{H}$); время удерживания 1,528 мин; метод LC-MS: колонка KINETEX-XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (98:2); подвижная фаза В: 10 mM формиат аммония в смеси вода:ацетонитрил (2:98); градиент: 20-100 % В в течение 4 минут, скорость потока 1,0 мл/мин, затем удерживание 0,6 минут при 100% В, скорость потока 1,5 мл/мин; затем градиент: 100-20% В в течение 0,1 минуты, скорость потока 1,5 мл/мин.

Промежуточное соединение 4

Стереохимия: А

(Цианометил) триметилфосфония йодид



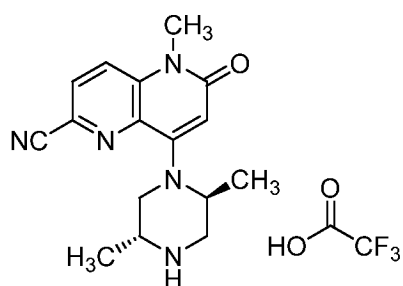
(Цианометил)триметилфосфония йодид получали в соответствии с общим способом, описанным в Zaragoza, F., et al., *J. Org. Chem.* 2001, 66, 2518-2521. В круглодонной колбе объемом 1 л триметилфосфин в толуоле (100 мл, 100 ммоль) разбавляли THF (50,0 мл) и толуолом (50,0 мл), и охлаждали на бане со льдом. Реакционную смесь интенсивно перемешивали, одновременно добавляя по каплям йодацетонитрил (7 мл, 16,7 г, 68,3 ммоль) с получением рыжевато-коричневого осадка. Охлаждающую баню удаляли и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при

комнатной температуре. Колбу помещали в соникатор для разрушения любых слипшихся твердых частиц. Реакционную смесь перемешивали еще 4 часа. Твердые вещества собирали фильтрованием и сушили под вакуумом с получением (цианометил)триметилфосфония йодида (16,6 г, 68,3 ммоль, выход 68,3%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 4.03 (d, $J=16.4$ Гц, 2H), 2.05 (d, $J=15.4$ Гц, 9H).

Промежуточное соединение 5

Стереохимия: гомохиральное

8-((2S,5R)-2,5-Диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил, TFA



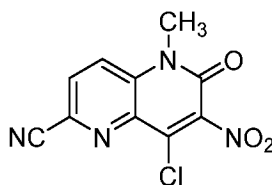
К раствору 6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил трифторметансульфоната (65 г, 195 ммоль) и трет-бутил (2R,5S)-2,5-диметилпиперазин-1-карбоксилата (43,9 г, 205 ммоль) в ацетонитриле (1,3 л) добавляли DIPEA (0,102 л, 585 ммоль). Раствор перемешивали при 80°C в течение 6 часов. Растворитель удаляли и неочищенный остаток подвергали хроматографии на силикагеле (продукт R_f 0,4 в 100% этилацетате). Получали продукт, трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)-2,5-диметилпиперазин-1-карбоксилат (75 г, 189 ммоль, выход 97%). LCMS: m/z = 398,2 (M+H); время удерживания 2,7 мин. Метод: колонка Kinetex XB-C18 (75x3 мм, 2,6 мкм), скорость потока 1 мл/мин; время градиентного элюирования 4 мин; от 20% растворителя В до 100% растворителя В; мониторинг при 254 нм (растворитель А: 98% воды : 2% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония; растворитель В: 2% воды : 98% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония).

К раствору трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)-2,5-диметилпиперазин-1-карбоксилата (30 г, 75 ммоль) в этилацетате (1000 мл) при 0°C добавляли HCl (4M в диоксане) (189 мл, 755 ммоль) и

доводили до комнатной температуры при перемешивании в течение 6 ч. Анализ LC/MS показал ~90% массы продукта при 0,60 RT вместе с ~4% массы амидного побочного продукта (что соответствует гидролизу нитрила) при 0,44 RT. Реакционную смесь разбавляли метил трет-бутиловым эфиром (MTBE, 2000 мл), перемешивали в течение 15 минут и отфильтровывали HCl соль продукта, промывали MTBE (100 мл). Соль HCl растворяли в воде (300 мл) и pH доводили до ~8, используя 10%-ный водный раствор бикарбоната натрия. Органическую часть экстрагировали DCM (5×250 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2×300 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали с получением 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (20 г, 65,2 ммоль, выход 86%). LCMS: m/z = 298.2 (M+H); время удерживания 0,5 мин. Метод: колонка Kinetex XB-C18 (75×3 мм, 2,6 мкм), скорость потока 1 мл/мин; время градиентного элюирования 4 мин; от 20% растворителя В до 100% растворителя В; мониторинг при 254 нм (растворитель А: 98% воды : 2% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония; растворитель В: 2% воды : 98% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония. ^1H NMR (400 МГц, CDCl_3) δ 7.79 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.70 (d, J = 12,3.2 Гц, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.80 (dd, J = 8.8 Гц, 1H) 3.70 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6 Гц, 3H), 1.15 (d, J = 6 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, Хлороформ-d) δ 161.9, 155.0, 138.5, 137.0, 128.2, 125.0, 122.2, 117.2, 111.3, 56.5, 51.9, 50.0, 49.5, 29.0, 18.8, 15.4.

Промежуточное соединение 6

8-Хлор-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил

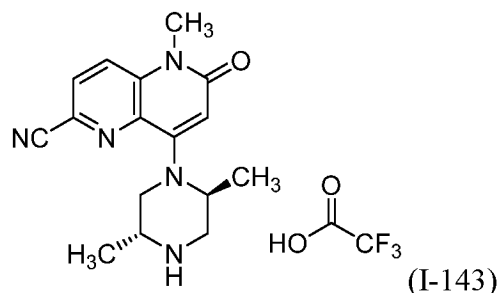


Во флакон 2 gram, содержащий 8-гидрокси-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил (192 мг, 0,780 ммоль), вносили магнитную мешалку и ацетонитрил (3,1 мл). Затем к суспензии добавляли DIEA (0,272 мл, 1,560 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1-2 минут, пока реакционная смесь не превратилась в гомогенный раствор желтого цвета. К реакционной смеси добавляли оксихлорид фосфора (0,131 мл, 1,404 ммоль). Флакон закрывали крышкой в атмосфере азота с выходом в масляный барботер. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов, затем к реакционной смеси добавляли

бензилтриэтиламмония хлорид (200 мг, 0,878 ммоль). Флакон закрывали крышкой в атмосфере азота, погружали в масляную баню (65°C) и нагревали в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали и летучие продукты реакции удаляли в вакууме с использованием роторного испарителя. Реакционный остаток растворяли в этилацетате, выливали в химический стакан со льдом (~10 мл) и затем переносили в делительную воронку. Водную фазу экстрагировали этилацетатом. Органические экстракты объединяли и последовательно промывали 1,5М K_2HPO_4 , насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и рассолом. Органический экстракт сушили над сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме с получением 204 мг коричневатого кристаллического твердого вещества. LCMS: Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1×50 мм, размер частиц 1,7 мкм; подвижная фаза А: 100% воды с 0,05% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 100% ацетонитрила с 0,05% трифторуксусной кислотой; температура: 40°C; градиент: 2-98% В в течение 1,5 минут, затем удерживание 0,5 минут при 98% В; скорость потока: 0,8 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм. Время удерживания = 1,01 мин.; наблюдаемые аддукты: $[M+H]^+$; наблюдаемые массы: 265,0 (слабая ионизация). 1H ЯМР (Хлороформ- d) δ 8.03 (d, $J=8.8$ Гц, 1H), 7.89-7.97 (m, 1H), 3.82 (s, 3H).

Промежуточное соединение 7

8-((2S,5R)-2,5-Диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил, TFA



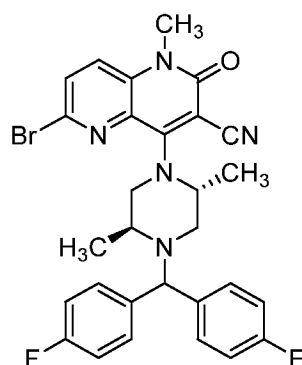
К раствору 6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил трифторметансульфоната (65 г, 195 ммоль) и трет-бутил (2R,5S)-2,5-диметилпиперазин-1-карбоксилата (43,9 г, 205 ммоль) в ацетонитриле (1,3 л) добавляли DIPEA (0,102 л, 585 ммоль). Раствор перемешивали при 80°C в течение 6 часов. Растворитель удаляли и неочищенный остаток подвергали хроматографии на силикагеле (продукт с R_f 0,4 в 100% этилацетате). Получали продукт, трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)-2,5-

диметилпиперазин-1-карбоксилат (75 г, 189 ммоль, выход 97%). LCMS: m/z = 398,2 (M+H); время удерживания 2,7 мин. Метод: колонка Kinetex XB-C18 (75x3 мм, 2,6 мкм), скорость потока 1 мл/мин; время градиентного элюирования 4 мин; от 20% растворителя В до 100% растворителя В; мониторинг при 254 нм (растворитель А: 98% воды: 2% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония; растворитель В: 2% воды : 98% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония).

К раствору трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)-2,5-диметилпиперазин-1-карбоксилата (30 г, 75 ммоль) в этилацетате (1000 мл) при 0°C добавляли HCl (4M в диоксане) (189 мл, 755 ммоль) и доводили до комнатной температуры при перемешивании в течение 6 ч. Анализ LC/MS показал ~90% массы продукта при 0,60 RT вместе с ~4% массы амидного побочного продукта (что соответствует гидролизу нитрила) при 0,44 RT. Реакционную смесь разбавляли метил-трет-бутиловым эфиром (MTBE, 2000 мл), перемешивали в течение 15 минут и отфильтровывали HCl соль продукта, промывали MTBE (100 мл). Соль HCl растворяли в воде (300 мл) и pH доводили до ~8, используя 10%-ный водный раствор бикарбоната натрия. Органическую часть экстрагировали DCM (5x250 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2x300 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали с получением 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (20 г, 65,2 ммоль, выход 86%). LCMS: m/z = 298,2 (M+H); время удерживания 0,5 мин. Метод: колонка Kinetex XB-C18 (75x3 мм, 2,6 мкм), скорость потока 1 мл/мин; время градиентного элюирования 4 мин; от 20% растворителя В до 100% растворителя В; мониторинг при 254 нм (растворитель А: 98% воды : 2% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония; растворитель В: 2% воды : 98% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7.79 (d, J= 8.8 Гц, 1H), 7.70 (d, J= 12,3.2 Гц, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.80 (dd, J= 8.8 Гц, 1H) 3.70 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 1.19 (d, J= 6 Гц, 3H), 1.15 (d, J= 6 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (75 МГц, Хлороформ-d) δ 161.9, 155.0, 138.5, 137.0, 128.2, 125.0, 122.2, 117.2, 111.3, 56.5, 51.9, 50.0, 49.5, 29.0, 18.8, 15.4. Стереохимия: гомохиральное

Способ синтеза DGKi Соединения 1

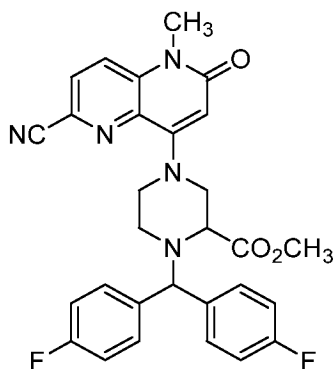
4-((2R,5S)-4-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 6-бром-3-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил трифторметансульфоната (80 мг, 0,194 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавляли DIPEA (0,102 мл, 0,582 ммоль) и HCl соль (2S,5R)-1-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазина (75 мг, 0,214 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 85°C в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток растворяли в этилацетате (15 мл). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем с использованием флэш-колонки на 24 г, элюируя 50-80% EtOAc в петролейном эфире. Фракции концентрировали при пониженном давлении с получением 4-((2R,5S)-4-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрил (95 мг, выход 85%); LCMS: m/z = 578.2 (M+H); t_r 3.916 мин.

Способ синтеза DGKi Соединения 2

Метил-1-(бис(4-фторфенил)метил)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)пиперазин-2-карбоксилат

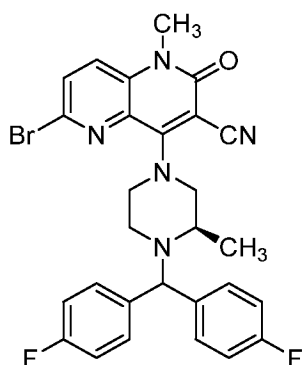


К перемешиваемому раствору 8-хлор-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (22,90 мг, 0,104 ммоль) в DMA (1 мл) и трет-бутаноле (4

мл) добавляли соль TFA метил 1-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-2-карбоксилата (40 мг, 0,087 ммоль) и карбоната цезия (85 мг, 0,261 ммоль) в атмосфере азота с последующим добавлением хлор(2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропокси-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)] палладия(II) (3,37 мг, 4,34 мкмоль). Реакционный сосуд погружали в масляную баню при температуре 70°C. Температуру бани повышали до 90°C в течение 2 мин и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и концентрировали под высоким вакуумом с получением коричневой смолы. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной HPLC при следующих условиях: колонка: Sunfire C18, 19×150 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония, pH 4,5, с уксусной кислотой; подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент: 30-100% В в течение 15 минут, затем удерживание 5 минут при 100% В; скорость потока: 17 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением с получением метил 1-(бис(4-фторфенил)метил)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил)пиперазин-2-карбоксилата (3,5 мг, 6,23 мкмоль, выход 7,17%). LCMS: m/z = 530,2 (M+H); rt 2.20 мин. Метод LC-MS: колонка-X Bridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм, 2,5 мкм; скорость потока 1,1 мл/мин; время градиентного элюирования 3 мин; температура: 50°C, от 0% растворителя В до 100% растворителя В; мониторинг при 220 нм (растворитель А: 95% воды : 5% ацетонитрила; 10 mM ацетат аммония; растворитель В: 5% воды : 95% ацетонитрила; 10 mM ацетат аммония). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 8.16 (d, $J=8.8$ Гц, 1H), 8.08 (d, $J=9.0$ Гц, 1H), 7.57 (dd, $J=8.8$, 5.6 Гц, 2H), 7.42-7.28 (m, 2H), 7.22-7.08 (m, 4H), 6.14 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.78 (d, $J=12.2$ Гц, 1H), 3.64 (d, $J=12.0$ Гц, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.45-3.35 (m, 2H), 3.15(dd, $J=12.5$, 3.9 Гц, 1H), 3.04 (td, $J=11.7$, 2.9 Гц, 1H), 2.71-2.63 (m, 1H).

Способ синтеза DGKi Соединения 3

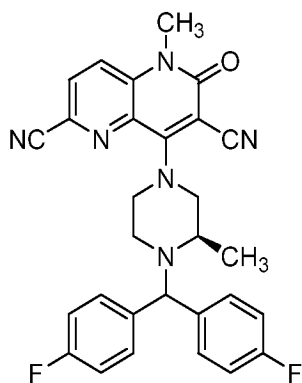
(R)-4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5- нафтиридин-3-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 6-бром-3-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-4-ил трифторметансульфоната (100 мг, 0,243 ммоль) в ацетонитриле (8 мл) добавляли DIPEA (0,127 мл, 0,728 ммоль) и HCl соль (R)-1-(бис(4-фторфенил)метил)-2-метилпиперазина (82 мг, 0,243 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 85°C в течение 5 мин и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали под высоким вакуумом с получением коричневой смолы. Неочищенное соединение очищали с помощью ISCO®, используя колонку с 12 г силикагеля; 60-67% этилацетата в петролейном эфире с получением (R)-4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрила (90 мг, выход 42,7%) в виде коричневой смолы; LCMS: m/z = 566,0 (M+2H); t_r 2,23 мин. Метод LC-MS: колонка AQUITY UPLC BEH C18 (3,0 x 50 мм), 1,7 мкм; подвижная фаза А: буфер : ацетонитрил (95:5); подвижная фаза В: буфер : ацетонитрил (5:95), буфер : 10 mM ацетат аммония; градиент: 20-100% В в течение 2,0 минут, затем удерживание 0,2 минуты при 100% В, скорость потока 0,7 мл/мин.

Способ синтеза DGKi Соединения 4

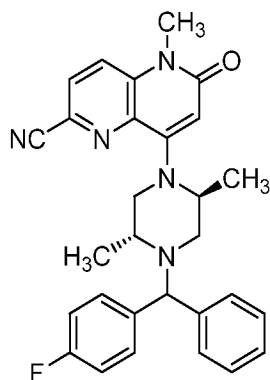
(R)-8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2, 7-дикарбонитрил



К перемешиваемому раствору (R)-4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-3-карбонитрила (90 мг, 0,159 ммоль) в NMP (5 мл) добавляли цинк (2,085 мг, 0,032 ммоль) и цианид цинка (37,4 мг, 0,319 ммоль) в атмосфере азота. Продувку азотом продолжали в течение 3 мин и добавляли dppf (5,30 мг, 9,57 мкмоль) и $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (14,6 мг, 0,016 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 5 минут и перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и концентрировали под высоким вакуумом с получением коричневой смолы. Неочищенный материал очищали препаративной HPLC. Метод HPLC: колонка SUNFIRE C18 (150 мм x внутренний диаметр 19 мм, 5 мкм); подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент: 40–60% В в течение 3,0 минут, скорость потока 17 мл/мин, затем удерживание 17 минут при 60-100% В, скорость потока 17 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали под высоким вакуумом. Затем образец разбавляли ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 1:3) и лиофилизировали в течение ночи с получением (R)-8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)-3-метилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2,7-дикарбонитрила (50 мг, выход 61,4%) в виде бледно-желтого твердого вещества. LCMS: $m/z = 511,2$ (M+H); t_r 3.520 мин. Метод LC-MS: Колонка KINETEX-XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM формиата аммония в воде : ацетонитрил (98:2); подвижная фаза В: 10 mM формиат аммония в воде : ацетонитрил (2:98); градиент: 20-100 % В в течение 4 минут, скорость потока 1,0 мл/мин, затем удерживание 0,6 минут при 100% В, скорость потока 1,5 мл/мин; затем градиент: 100-20% В в течение 0,1 минуты, скорость потока 1,5 мл/мин. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8.26 (d, $J=8.8$ Гц, 1H), 8.15 (d, $J=9.0$ Гц, 1H), 7.56 (dd, $J=11.9$, 8.7 Гц, 2H), 7.57 (dd, $J=11.7$, 8.8 Гц, 2H), 7.16 (t, $J=8.9$ Гц, 4H), 4.90 (s, 1H), 4.10 (d, $J=13.0$ Гц, 1H), 4.01 (d, $J=12.5$ Гц, 1H), 3.86 (dd, $J=12.2$, 2.9 Гц, 1H), 3.66-3.55 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.08-2.97 (m, 1H), 2.97-2.90 (m, 1H), 2.90 (s, 1H), 1.03 (d, $J=6.6$ Гц, 3H).

Способ синтеза DGKi Соединения 5

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(фенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1, 5-нафтиридин-2-карбонитрил



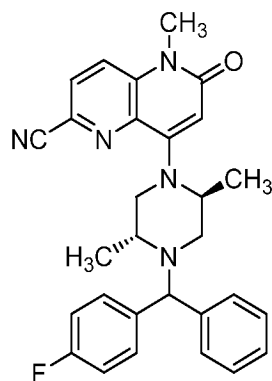
В герметичном флаконе 2 драм 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил, TFA (41,1 мг, 100 мкмоль), (4-фторфенил)(фенил)метанол (28,3 мг, 140 мкмоль) и (цианометил)триметилфосфония йодид (48,6 мг, 200 мкмоль) объединяли в ацетонитриле (200 мкл). Добавляли основание Хунига (75 мкл, 429 мкмоль) и реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 2 часов. Реакционную смесь вводили напрямую в колонку с 12 г силикагеля и элюировали 20-100% этилацетата в гексанах с получением соединения по примеру 182 в виде диастереомерной смеси. Аналитические условия LC\MS: вводимый объем = 3 мкл, начальный %B 0, конечный %B 100, время градиентного элюирования 2 минуты, скорость потока 1 мл/мин, длина волны 220 нм, пара растворителей ацетонитрил/вода/трифторуксусная кислота, растворитель А 10% ацетонитрила, 90% воды/0,05% TFA, растворитель В 10% воды, 90% ацетонитрила/0,05% TFA, колонка Acquity ВЕН C18 21 x 50 мм, 1,7 мкм, температура термостата = 40°C. Результаты LC\MS; время удерживания 1,4 минуты, наблюдаемая масса 482,5 (M⁺).

Неочищенный продукт далее очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, частицы 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил : вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил : вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: удерживание 0 минут при 47% В, 47-87% В в течение 20 минут, затем удерживание 4 минуты при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали MS сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центрифужного выпаривания с получением 14,4 мг указанного в заголовке соединения (выход 30%). Расчетная молекулярная масса 481,575. Условия LC\MS: QC-ACN-TFA-XB: наблюдаемый в спектре MS ион 482,2, время удерживания 1,6 минуты. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 8.18-8.10 (m, 1H), 8.06 (d, J=8.8 Гц, 1H), 7.68-7.48 (m, 4H), 7.39-

7.26 (m, 2H), 7.25-7.08 (m, 3H), 6.00 (s, 1H), 4.67 (br s, 1H), 4.59 (br d, $J=6.7$ Гц, 1H), 3.76-3.62 (m, 1H), 3.55 (br d, $J=12.8$ Гц, 1H), 3.15-3.04 (m, 1H), 2.90-2.81 (m, 1H), 2.36 (br dd, $J=17.4, 11.9$ Гц, 1H), 1.35-1.28 (m, 3H), 1.24 (s, 1H), 1.07 (br t, $J=5.6$ Гц, 3H).

Способ синтеза DGKi соединений 6 и 7

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(фенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



Соединение по примеру 5 разделяли на индивидуальные диастереомеры с использованием хиральной твердофазной хроматографии: колонка: Chiralpak OJ-H, 21×250 мм; 5 микрон, подвижная фаза: 90% CO₂/10% метанол, условия потока: 45 мл/мин, длина волны детектора: 225 нм, параметры ввода: 500 мкл, 15 мг, растворенные в 1 мл метанола/ацетонитрила.

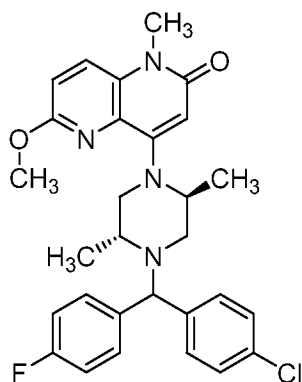
Первый элюируемый диастереомер, соединение по примеру 6 (66,4 мг) выделяли с выходом 20,2%. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 1: чистота: 100,0 %; наблюдаемая масса: 482,1; время удерживания: 2,49 мин. Условия инъекции 2: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин;

детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 482,11; время удерживания: 1,75 мин.

Второй элюируемый диастереомер, соединение по примеру 7 (71,7 мг), выделяли с выходом 21,9%. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 1: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 482,11; время удерживания: 2,51 мин. Условия инъекции 2: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 482,1; время удерживания: 1,76 мин.

Способ синтеза DGKi Соединения 8

4-[(2S,5R)-4-[(4-хлорфенил)(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-6-метокси-1-метил-1,2-дигидро-1,5-нафтиридин-2-он

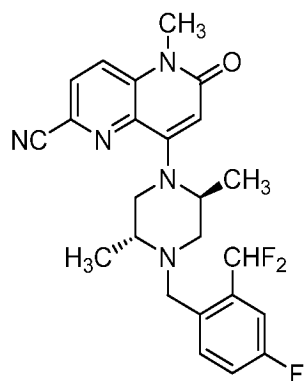


4-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-6-метокси-1-метил-1,5-нафтиридин-2(1H)-он (50 мг, 0,165 ммоль) и 1-(бром(4-хлорфенил)метил)-4-фторбензол (49,5 мг, 0,165 ммоль) смешивали с диизопропилэтиламином (0,173 мл, 0,992 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) и реакционную смесь нагревали при 55°C в течение ночи. Анализ

LC/MS показал завершение реакции. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: удерживание 0 минут при 42% В, 42-82% В в течение 25 минут, затем удерживание 5 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Расчетная молекулярная масса 521,03. Условия LC\MS QC-ACN-AA-XB: наблюдаемый на спектре MS ион 521,1, время удерживания 2,77 минут.

Способ синтеза DGKi соединения 9

8-[(2S,5R)-4-{[2-(диформетил)-4-фторфенил]метил}-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил

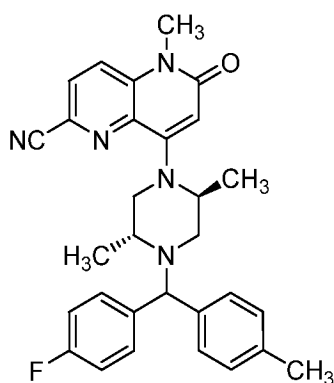


К раствору 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (30 мг, 0,081 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли 2-(диформетил)-4-фторбензальдегид (16,86 мг, 0,097 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли цианоборгидрид натрия (15,22 мг, 0,242 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Анализ LC/MS показал завершение реакции. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, частицы 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: удерживание 0 минут при 31% В, 31-71% В в течение 25 минут, затем удерживание 5 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС и УФ сигналами. Фракции,

содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 13,0 мг, а чистота, оцененная с помощью анализа LCMS, составила 100%. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LCMS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 1: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 456,08; время удерживания: 1,39 мин. Условия инъекции 2: Колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 456,07; время удерживания: 2,22 мин. %В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100 %В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 456,07; время удерживания: 2,22 мин.

Способ синтеза DGKi Соединения 10

8-[(2S,5R)-4-[(4-фторфенил)(4-метилфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро- 1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



К смеси 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, TFA (68,6 мг, 60 масс.%, 0,1 ммоль), (цианометил)триметилфосфония йодида (48,6 мг, 0,200 ммоль) и (4-фторфенил)(п-

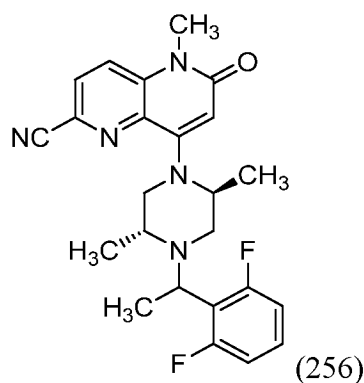
толил)метанола (26,0 мг, 0,120 ммоль) в ацетонитриле (0,3 мл) добавляли основание Хунига (0,105 мл, 0,600 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 110°C в течение 2 часов с последующим вторым добавлением (цианометил)триметилфосфония йодида (48,6 мг, 0,200 ммоль), (4-фторфенил)(п-толил)метанола (26,0 мг, 0,120 ммоль) и основания Хунига (0,058 мл, 0,300 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 110°C еще 2 часа. Неочищенную реакционную смесь вводили напрямую на 12 г Si-RediSep Rf для флэш-хроматографии с использованием 20-100% этилацетата в гексанах. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили в вакууме. Полученный продукт дополнительно очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент: удерживание 0 минут при 20% В, 20–60% В в течение 25 минут, затем удерживание 5 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС и УФ сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Выход диастереомерного продукта в виде соли TFA составил 47,1 мг.

Диастереомерный продукт разделяли на два диастереомера с помощью SFC-хиральной хроматографии при следующих условиях: колонка: Chiral AD, 30×250 мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: 80% CO₂/20% IPA с 0,1% DEA; скорость потока: 100 мл/мин; температура колонки: 25°C. Указанное в заголовке соединение собирали на 2-м пике элюирования, >91% de. Расчетная молекулярная масса 495,602. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм × 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 1: чистота: 97,6%; наблюдаемая масса: 496,26; время удерживания: 2,52 мин. Условия инъекции 2: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм × 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание 0,50 мин при 100% В; скорость

потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 98,2%; наблюдаемая масса: 496,28; время удерживания: 1,73 мин.

Способ синтеза DGKi Соединения 11

8-[(2S,5R)-4-[1-(2,6-дифторфенил)этил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил

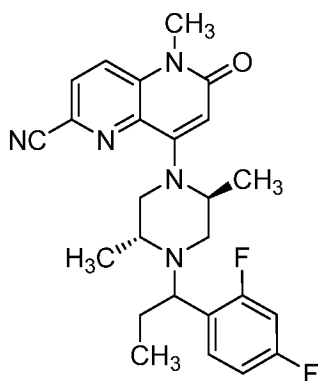


К смеси 2-(1-бромэтил)-1,3-дифторбензола (15,12 мг, 0,065 ммоль) и 5-метил-6-оксо-8-(пиперазин-1-ил)-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2,7-дикарбонитрила, TFA (34,0 мг, 60 масс.%, 0,05 ммоль) в ацетонитриле (0,3 мл) добавляли основание Хунига (0,052 мл, 0,300 ммоль). Смесь перемешивали при 55°C в течение 2 часов. Анализ LCMS показал полное превращение в продукт. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: удерживание при 37% В в течение 0 минут, 37-77% В в течение 20 минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС и УФ сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 12,1 мг. Расчетная молекулярная масса 437,495. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание при 100% В в течение 0,50 мин; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции

1: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 438,14; время удерживания: 2,36 мин. Условия инъекции 2: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание при 100% В в течение 0,50 мин; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 438,14; время удерживания: 1,2 мин.

Способ синтеза DGKi Соединений 12-14

8-((2S,5R)-4-(1-(2,4-дифторфенил)пропил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



К смеси 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (29,7 мг, 0,1 ммоль) и 1-(1-бромпропил)-2,4-дифторбензола (25,9 мг, 0,110 ммоль) в ацетонитриле (0,3 мл) добавляли основание Хунига (87 мкл, 0,500 ммоль). Смесь перемешивали на горячей плите при 55°C в течение 16 часов. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент: удерживание 0 минут при 3% В, 3-43% В в течение 25 минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС и УФ сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Стереохимия: диастереомерная смесь.

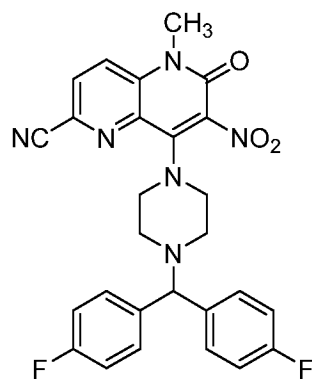
Диастереомерную смесь синтеза соединения 12 DGKi дополнительно разделяли для разделения двух гомохиральных диастереомеров с использованием SFC-хиральной хроматографии в следующих условиях: колонка: хиральная OD, 30×250 мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: 15% IPA/85% CO₂ с 0,1% DEA; скорость потока: 100 мл/мин; длина волны детектора: 220 нм.

DGKi Соединение 13 (изомер 1) собирали в виде первого пика элюента в 95% de. Stereoхимия: гомохиральное соединение.

DGKi Соединение 14 (изомер 2) собирали в виде второго пика элюента в 95% de. Stereoхимия: гомохиральное соединение.

Способ синтеза DGKi Соединения 15

8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил



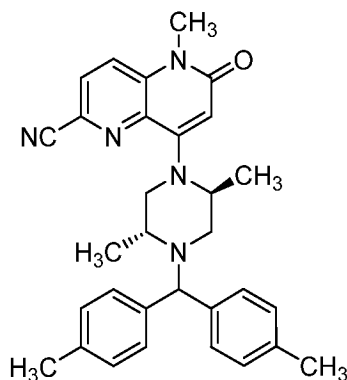
DMF барботировали азотом в течение 1 часа. Во флакон 1 dram помещали цинк (0,95 мг, 0,015 ммоль), димер бром(три-трет-бутилфосфин)палладия(I) (9,96 мг, 0,013 ммоль) и 4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-6-бром-1-метил-3-нитро-1,5-нафтиридин-2(1H)-он (21,38 мг, 0,037 ммоль). Добавляли барботированный DMF (0,3 мл), смесь закрывали крышкой в атмосфере азота и погружали в масляную баню при 50°C на 15 минут. Добавляли дицианоцинк (2,86 мг, 0,024 ммоль). Реакционную смесь закрывали в атмосфере азота и погружали в масляную баню при 50°C на 3 часа. Анализ LC/MS показал завершение реакции. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: голонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 50-90% B в течение 15

минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Указанное в заголовке соединение (11,4 мг) выделяли с выходом 59,7%.

Альтернативный синтез: Раствор 8-хлор-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила (750 мг, 2,83 ммоль) в DMF (6 мл) объединяли с 1-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазином (899 мг, 3,12 ммоль) с последующим добавлением основания Хунига (0,990 мл, 5,67 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Анализ LC/MS показал завершение реакции. Неочищенный продукт фильтровали и очищали препаративной HPLC с использованием водного раствора ацетонитрила с ацетатом аммония в качестве буфера с получением 1,02 г твердого вещества желтого цвета. Для определения конечной чистоты использовали две инъекции аналитическим методом LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1×50 мм, размер частиц 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 минут, затем удерживание при 100% В в течение 0,75 минут; скорость потока: 1,0 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм. Условия инъекции 2: колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 мм, размер частиц 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: 0-100 % В в течение 3 минут, затем удерживание при 100% В в течение 0,75 минут; скорость потока: 1,0 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм. Результаты инъекции 1: чистота: 100%; наблюдаемая масса: 517,0; время удерживания: 2,4 минуты. Результаты инъекции 2: чистота: 98,4%; наблюдаемая масса: 517,0; время удерживания: 1,7 минуты. ¹H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 7.88 (d, J=8.7 Гц, 1H), 7.76 (d, J=8.9 Гц, 1H), 7.40 (dd, J=8.5, 5.5 Гц, 4H), 7.02 (t, J=8.7 Гц, 4H), 4.34 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.62-3.55 (m, 4H), 2.64 (br s, 4H). ¹³C ЯМР (126 МГц, хлороформ-d) δ 163.0, 161.0, 155.4, 147.0, 138.0, 137.7, 137.7, 135.9, 132.4, 129.5, 129.2, 129.2, 126.0, 123.1, 116.5, 115.8, 115.6, 74.3, 51.6, 51.2, 29.7.

Способ синтеза Соединения 16 DGKi

8-[(2S,5R)-4-[бис(4-метилфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5- нафтиридин-2-карбонитрил



К смеси (цианометил)триметилфосфония иодида (46,2 мг, 0,19 ммоль), ди-п-толилметанола (23,46 мг, 0,108 ммоль) и 8-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-5-метил-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, TFA (72,4 мг, 54 масс.%, 0,095 ммоль) в ацетонитриле (0,3 мл) добавляли основание Хунига (0,10 мл, 0,57 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 110°C в течение 2 часов. Неочищенный продукт очищали препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: удерживание при 55% В в течение 0 минут, 55-95% В в течение 20 минут, затем удерживание при 100% В в течение 4 минут; скорость потока: 20 мл/мин; температура колонки: 25°C. Сбор фракций инициировали МС и УФ сигналами. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 23,4 мг. Расчетная молекулярная масса 491,639. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую LC/MS. Условия инъекции 1: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание при 100% В в течение 0,75 мин; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 1: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 492,21; время удерживания: 2,77 мин. Условия инъекции 2: колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: от 0% В до 100% В в течение 3 мин, затем удерживание при 100% В в течение 0,75

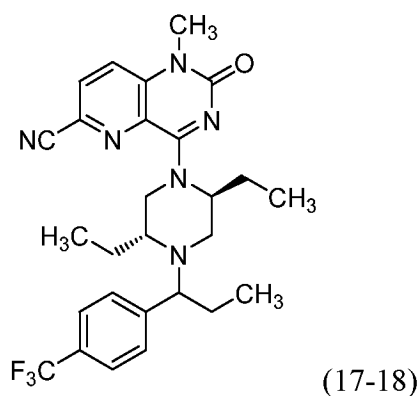
мин; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты инъекции 2: чистота: 100,0%; наблюдаемая масса: 492,2; время удерживания: 1,71 мин.

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8.15 (d, $J = 8.5$ Гц, 1 H), 8.04-8.09 (m, 1 H), 7.81 (s, 4 H), 7.57-7.63 (m, 2 H), 7.12-7.19 (m, 2 H), 6.00 (s, 1 H), 4.82 (s, 1 H), 4.52-4.63 (m, 1 H), 3.64-3.76 (m, 1 H), 3.51-3.58 (m, 4 H), 2.99-3.10 (m, 1 H), 2.86 (br d, $J = 8.5$ Гц, 1 H), 2.28-2.37 (m, 1 H), 1.31 (d, $J = 6.5$ Гц, 3 H), 1.07 (d, $J = 6.5$ Гц, 3 H). ^{13}C ЯМР (100.66 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 162.4, 160.9, 159.9, 153.5, 148.0, 138.7, 138.6, 135.0, 132.6, 129.3 (d, $J = 8.0$ Гц), 128.8 (d, $J = 10.0$ Гц), 124.0, 122.8, 118.6, 117.5, 115.6, 115.4, 109.8, 104.8, 69.0, 51.8, 49.4, 48.9, 47.2, 28.6, 13.4, 7.4.

Ссылка: PCT/US2020/048070

Соединения 17 и 18 DGKi

4-((2S,5R)-2,5-диэтил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)пропил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо [3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



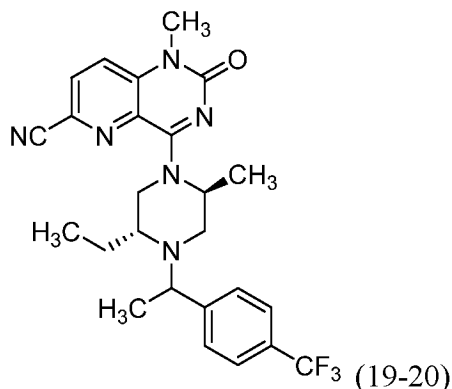
К перемешиваемому раствору 4-((2S,5R)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрила, TFA (0,12 г, 0,27 ммоль) в ацетонитриле (10 мл), добавляли DIPEA (0,14 мл, 0,82 ммоль), 1-(1-хлорпропил)-4-(трифторметил)бензол (0,12 г, 0,55 ммоль) и иодид натрия (0,04 г, 0,27 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC [метод HPLC: колонка: Sunfire C18, 150×внутренний диаметр 19 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент: 0-100% В в течение 18 минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 17 мл/мин]. Фракции концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали из EtOH/H₂O (1:5) с получением соединений 17 и 18.

Соединение 17: (10 мг, выход 7%); LCMS: $m/z = 513,3$ (M+H); rt 2,52 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, 2,5 мкм, подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 8.24 (d, $J=6.6$ Гц, 1H), 7.98 (d, $J=9.0$ Гц, 1H), 7.73 (d, $J=8.1$ Гц, 2H), 7.56 (d, $J=7.1$ Гц, 2H), 5.83-5.48 (m, 1H), 4.98-4.86 (m, 1H), 3.64 (br. s., 1H), 3.43 (s, 3H), 3.08 (d, $J=9.8$ Гц, 1H), 2.93-2.82 (m, 2H), 2.42-2.26 (m, 1H), 2.13-2.08 (m, 1H), 1.98-1.82 (m, 3H), 1.66-1.54 (m, 1H), 1.44-1.31 (m, 1H), 0.98-0.91 (br. s., 3H), 0.69-0.53 (m, 6H).

Соединение 18: (3 мг, выход 2%); LCMS: $m/z = 513,3$ (M+H); rt 2,54 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, 2,5 мкм, подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 8.28-8.19 (m, 1H), 8.01-7.95 (m, 1H), 7.72 (d, $J=7.8$ Гц, 2H), 7.58 (d, $J=8.6$ Гц, 2H), 6.06-5.28 (m, 1H), 5.08-4.76 (m, 1H), 3.64-3.50 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.16-3.08 (m, 1H), 2.25-2.14 (m, 2H), 2.00-1.83 (m, 3H), 1.57-1.53 (m, 3H), 1.03-0.89 (m, 3H), 0.65-0.54 (m, 6H).

Соединения 19 и 20 DGKi

4-((2*S*,5*R*)-5-Этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2 -дигидропиридо[3,2-*d'*]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d'*]пиримидин-6-карбонитрила, TFA (70 мг, 0,22 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (0,12 мл, 0,67 ммоль), 1-(1-хлорэтил)-4-(трифторметил)бензол (93 мг, 0,45 ммоль), иодид натрия (33,6 мг, 0,22 ммоль) и нагревали при 85°C в течение 16 ч. Реакционную смесь

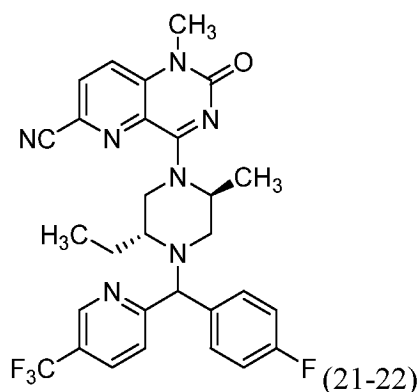
охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в этилацетате (100 мл). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC [метод HPLC: колонка: Sunfire C18 (150 мм x внутренний диаметр 19,2 мм, 5 мкм), подвижная фаза А = 10 mM ацетат аммония в воде, подвижная фаза В = ацетонитрил, скорость потока: 19 мл/мин], фракции концентрировали при пониженном давлении, разбавляли смесью $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:5) и лиофилизировали с получением соединений 19 и 20.

Соединение 19: (9 мг, выход 8%); LCMS: $m/z = 485,1$ (M+H); rt 2,34 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм), 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-3; %В: 0-100. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8.32-8.17 (m, 1H), 8.05-7.94 (m, 1H), 7.76-7.66 (m, 2H), 7.66-7.55 (m, 2H), 6.11-5.42 (m, 1H), 5.10-4.79 (m, 1H), 3.78-3.59 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.17-3.05 (m, 1H), 2.64-2.55 (m, 1H), 2.26-2.09 (m, 1H), 1.65-1.34 (m, 3H), 1.31-1.16 (m, 5H), 1.01 (br t, $J=7.1$ Гц, 3H).

Соединение 20: (9 мг, выход 8%); LCMS: $m/z = 485,1$ (M+H); rt 2,29 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм), 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; Время (мин): 0-3; %В: 0-100%). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8.24 (br d, $J=8.6$ Гц, 1H), 7.99 (d, $J=9.0$ Гц, 1H), 7.73 (d, $J=8.3$ Гц, 2H), 7.61 (br d, $J=8.3$ Гц, 2H), 5.87-5.63 (m, 1H), 5.10-4.79 (m, 1H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.46-3.15 (m, 1H), 2.89-2.73 (m, 2H), 2.41-2.34 (m, 1H), 1.63-1.34 (m, 5H), 1.29 (br d, $J=6.1$ Гц, 3H), 0.79-0.64 (m, 3H).

Соединения 21 и 22 DGKi

4-((2S,5R)-5-Этил-4-((4-фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрила, TFA (0,5 г, 1,17 ммоль) в ацетонитриле (10 мл), добавляли DIPEA (1,02 мл, 5,86 ммоль) с последующим 2-(бром(4-фторфенил)метил)-5-(трифторметил)пиридином (0,78 мг, 2,35 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC (метод HPLC: колонка: INERTSIL ODS 21,2 x 250 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент: 30-80% В в течение 14 минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 17 мл/мин), фракции концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали из (EtOH/H₂O, 1:5) с получением соединения 21 и соединения 22.

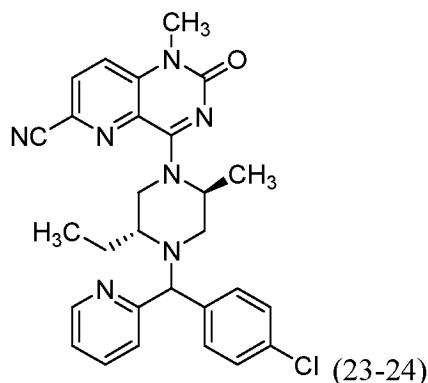
Соединение 21: 140 мг, выход 21%; LCMS: m/z = 566,2 (M+H); t_r 3,26 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода:2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода: 98% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.83 (br s, 1 H), 8.19-8.31 (m, 2 H), 7.95-8.12 (m, 2 H), 7.53-7.63 (m, 2 H), 7.12-7.26 (m, 2 H), 5.41-6.26 (m, 1 H), 4.79-5.20 (m, 2 H), 3.60-3.74 (m, 1 H), 3.44 (s, 3 H), 2.73-2.87 (m, 1 H), 2.22-2.42 (m, 2 H), 1.40-1.68 (m, 5 H), 0.53-0.71 (m, 3 H).

Соединение 22: 155 мг, выход 23%; LCMS: m/z = 566,2 (M+H); t_r 3,25 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода: 2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода:98% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ ppm

8.92 (s, 1 H), 8.17-8.27 (m, 2 H), 7.90-8.02 (m, 2 H), 7.60-7.67 (m, 2 H), 7.14-7.22 (m, 2 H), 5.52-6.07 (m, 1 H), 4.87-5.08 (m, 2 H), 3.39-3.71 (m, 4 H), 2.69-2.78 (m, 1 H), 2.37-2.45 (m, 1 H), 1.37-1.69 (m, 5 H), 0.58-0.77 (m, 3 H).

Соединения 23-24 DGKi

(4-((2*S*,5*R*)-4-((4-хлорфенил)(пиридин-2-ил)метил)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрила (100 мг, 0,32 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавляли DIPEA (0,3 мл, 1,60 ммоль) с последующим 2-(бром(4-хлорфенил)метил)пиридином (181 мг, 0,64 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC (метод HPLC: колонка: Cellulose-5 (250*внутренний диаметр 20), 5 микрон; подвижная фаза А: 0,1% DEA в IPA; подвижная фаза В: 0,1% DEA в ACN; градиент: 90% В, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 18 мл/мин), фракции концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали из (EtOH/H₂O, 1:5) с получением соединения 23 и соединения 24.

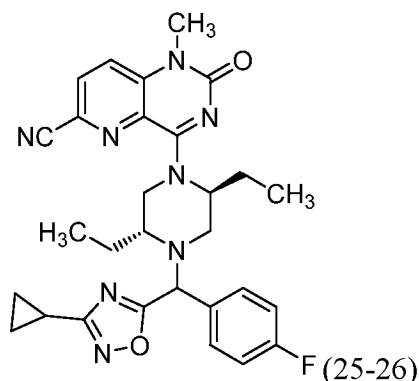
Соединение 23: 24 мг, выход 14%; LCMS: m/z = 514,2 (M+H); t_r 2,94 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода:2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода:98% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ ppm 8.52 (d, J =4.5 Гц, 1 H), 8.23 (d, J =9.0 Гц, 1 H), 7.96-8.02 (m, 1 H), 7.75-7.81 (m, 1 H), 7.59-7.68 (m, 3 H),

7.39 (d, $J=8.5$ Гц, 2 H), 7.22-7.29 (m, 1 H), 5.54-5.95 (m, 1 H), 4.81-5.07 (m, 2 H), 3.39-3.68 (m, 5 H), 2.69-2.76 (m, 1 H), 2.35-2.44 (m, 1 H), 1.37-1.67 (m, 5 H), 0.58-0.67 (m, 3 H).

Соединение 24: 22 мг, выход 13%; LCMS: $m/z = 514,2$ (M+H); rt 2,94 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75x3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода:2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода:98% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ ppm 8.41-8.45 (m, 1 H), 8.23 (d, $J=9.0$ Гц, 1 H), 7.96-8.02 (m, 1 H), 7.78-7.85 (m, 2 H), 7.53-7.61 (m, 2 H), 7.40 (d, $J=8.5$ Гц, 2 H), 7.20-7.26 (m, 1 H), 5.52-5.97 (m, 1 H), 4.87-5.04 (m, 1 H), 4.78-4.86 (m, 1 H), 3.37-3.71 (m, 4 H), 2.72-2.78 (m, 1 H), 2.54-2.63 (m, 1 H), 2.35-2.46 (m, 1 H), 1.40-1.64 (m, 5 H), 0.58-0.70 (m, 3 H).

Соединения 25 и 26 DGKi

4-((2S,5R)-4-((3-Циклопропил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1- метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 2-((2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-4-ил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-2-(4-фторфенил)-уксусной кислоты (0,045 г, 0,09 ммоль), N-гидроксициклопропанкарбоксимидамида (9,4 мг, 0,09 ммоль) в DMF (2 мл) при комнатной температуре добавляли BOP (0,01 г, 0,23 ммоль) и триэтиламин (0,04 мл, 0,23 ммоль). Через 2 часа реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC. Метод хирального разделения:

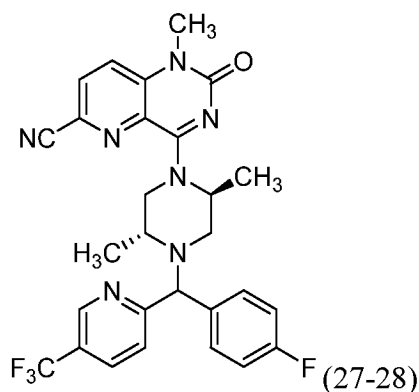
колонка: DAD-1-Cellulose-2 (250×4,6 мм), 5 микрон. Подвижная фаза: 0,1% DEA в ацетонитриле, скорость потока: 2,0 мл/мин.

Соединение 25: (1,9 мг, выход 6%). LCMS: m/z , 543,3 (M+H); t_r 2,21 мин; метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-3; %В: 0-100%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 8.29-8.16 (m, 1H), 8.06-7.92 (m, 1H), 7.75-7.58 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 6.01-5.32 (m, 1H), 5.28 (br s, 1H), 5.00-4.79 (m, 1H), 3.66-3.56 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 2.65-2.57 (m, 1H), 2.44-2.34 (m, 2H), 2.18-2.00 (m, 1H), 1.95-1.74 (m, 2H), 1.68-1.34 (m, 2H), 1.15-1.02 (m, 2H), 0.93-0.83 (m, 2H), 0.81-0.62 (m, 6H).

Соединение 26: (1,0 мг, выход 3 %). LCMS: m/z , 543,3 (M+H); t_r 2,20 мин; метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; Время (мин): 0-3; %В: 0-100%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 8.23 (d, $J=8.8$ Гц, 1H), 8.06-7.91 (m, 1H), 7.62 (dd, $J=6.2, 7.5$ Гц, 2H), 7.26 (t, $J=8.8$ Гц, 2H), 5.92-5.31 (m, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.96-4.78 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.25-3.10 (m, 1H), 2.97-2.75 (m, 2H), 2.27-1.65 (m, 3H), 1.49-1.24 (m, 2H), 1.11-0.97 (m, 2H), 0.94-0.75 (m, 5H), 0.74-0.50 (m, 3H).

Соединения 27 и 28 DGKi

4-((2*S*,5*R*)-4-((4-фторфенил)(5-(трифторметил)пиридин-2-ил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрила (1 г, 3,35 ммоль) в

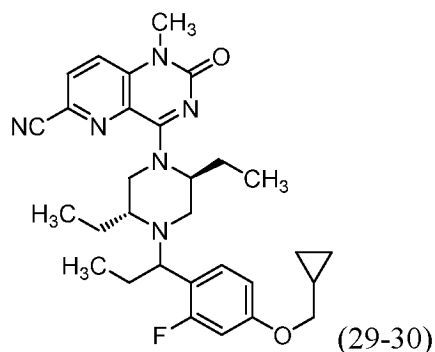
ацетонитриле (10 мл) добавляли DIPEA (5,9 мл, 33,5 ммоль) с последующим 2-(бром(4-фторфенил)метил)-5-(трифторметил)пиридином (2,24 г, 6,70 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC (метод HPLC: колонка: Sunfire C18, 150 x внутренний диаметр 19 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде; подвижная фаза В: ацетонитрил:MeOH (1:1); градиент: 50-100% В в течение 20 минут, затем удерживание при 100% В в течение 5 минут; скорость потока: 19 мл/мин), фракции концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали из (EtOH/H₂O, 1:5) с получением соединения 27 и соединения 28.

Соединение 27: 110 мг, выход 6%; LCMS: m/z = 552,2 (M+H); t_r 3,09 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода:2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода:98% ацетонитрила; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; Время (мин): 0-4; %В: 20-100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.83 (s, 1H), 8.22 (d, J = 9.0 Гц, 2H), 8.11-7.95 (m, 2H), 7.71-7.58 (m, 2H), 7.25-7.13 (m, 2H), 5.76-5.44 (m, 1H), 5.13-4.67 (m, 2H), 3.86-3.49 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.19-3.08 (m, 1H), 2.84 (dd, J = 3.8, 12.3 Гц, 1H), 2.38-2.26 (m, 1H), 1.67-1.39 (m, 3H), 1.11-0.86 (m, 3H).

Соединение 28: 145 мг, выход 8%; LCMS: m/z = 552,2 (M+H); t_r 3,09 мин; (метод LCMS: колонка: Column-Kinetex XB-C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза А: 98% вода:2% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; подвижная фаза В: 2% вода: 98% ацетонитрил; 10 mM формиат аммония; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-4; %В: 0-100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.91 (s, 1H), 8.27-8.16 (m, 2H), 7.99 (d, J = 9.0 Гц, 2H), 7.69-7.57 (m, 2H), 7.23-7.13 (m, 2H), 5.77-5.41 (m, 1H), 5.09-4.62 (m, 2H), 3.90-3.65 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.14-3.02 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 1H), 1.61-1.40 (m, 3H), 1.10-0.93 (m, 3H) [1H скрыт пиком растворителя].

Соединения 29 и 30 DGKi

4-((2S,5R)-4-(1-(4-(Циклопропилметокси)-2-фторфенил)пропил)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2 -дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрила, HCl (200 мг, 0,55 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавляли DIPEA (0,3 мл, 1,65 ммоль), иодид натрия (83 мг, 0,55 ммоль) и 1-(1-хлорпропил)-4-(циклопропилметокси)-2-фторбензол (268 мг, 1,1 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 16 ч. Реакционной смеси давали остыть до комнатной температуры. Добавляли еще одну порцию 1-(1-хлорпропил)-4-(циклопропилметокси)-2-фторбензола (268 мг, 1,102 ммоль) и продолжали нагревание еще 16 ч. Реакционную смесь охлаждали, растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток растворяли в этилацетате (10×20 мл). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC. Метод HPLC: колонка: EXRS (20 x 250 мм, 5 мкм), подвижная фаза А - 10 mM ацетат аммония в воде R, подвижная фаза А-В: ацетонитрил, скорость потока: 20 мл/мин.

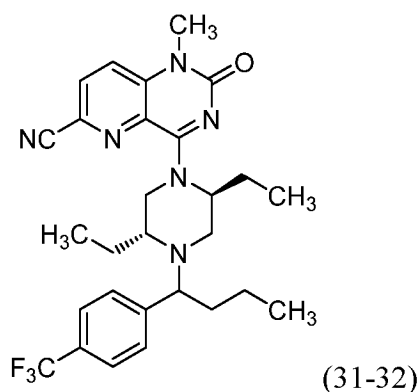
Фракцию 1 концентрировали при пониженном давлении, продукт разбавляли (EtOH/H₂O, 1:5) и лиофилизировали с получением соединения 29 (35 мг, выход 11,6%); LCMS: *m/z*, 533,4 [M+H]⁺, *rt* 1,57 мин; (метод LCMS: колонка: KINETIX XB C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония в воде (pH 3,3), подвижная фаза В: ацетонитрил. ¹H ЯМР (DMSO-*d*₆, 400 МГц) δ (ppm) 8.23 (d, *J*=9.0 Гц, 1H), 7.97 (d, *J*=9.0 Гц, 1H), 7.33 (m, 1H), 6.62-6.92 (m, 2H), 5.29-6.06 (m, 1H), 4.70-5.05 (m, 1H), 3.82 (m, 3H), 3.43 (s, 3H), 2.99-3.10 (m, 1H), 2.80-2.87 (m, 1H), 2.63-2.78 (m, 1H), 2.33 (s, 1H), 1.74-2.11 (m, 3H), 1.51-1.66 (m, 1H), 1.17-1.46 (m, 3H), 0.84-1.01 (m, 3H), 0.61-0.78 (m, 6H), 0.53-0.61 (m, 2H), 0.29-0.35 (m, 2H).

Фракцию 2 концентрировали при пониженном давлении, продукт разбавляли (EtOH/H₂O, 1:5) и лиофилизировали с получением соединения 30 (37 мг, выход 12,35%); LCMS: *m/z*, 533,4 [M+H]⁺, *rt* 2,72 мин; [(метод LCMS: колонка: KINETIX XB C18 (75 x 3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония в воде (pH 3,3),

подвижная фаза В: ацетонитрил. ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , 400 МГц): δ (ppm) 8.13-8.35 (m, 1H), 7.98 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 6.61-6.89 (m, 2H), 5.18-6.15 (m, 1H), 4.66-5.13 (m, 1H), 3.63-3.90 (m, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.25 (m, 1H), 3.00-3.15 (m, 1H), 2.63-2.70 (m, 1H), 2.26-2.38 (m, 1H), 1.81 (m, 3H), 1.35-1.61 (m, 2H), 1.15-1.26 (m, 2H), 0.88-1.00 (m, 3H), 0.61-0.71 (m, 6H), 0.51-0.59 (m, 2H), 0.32 (m, 2H).

Соединения 31 и 32 DGKi

4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)бутил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо [3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору 4-((2*S*,5*R*)-2,5-диэтилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридо[3,2-*d*]пиримидин-6-карбонитрила, HCl (0,4 г, 1,1 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавляли DIPEA (0,6 мл, 3,31 ммоль) с последующим 1-(1-хлорбутил)-4-трифторметил)бензолом (0,783 г, 3,31 ммоль) и иодидом натрия (0,165 г, 1,102 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита, промывали этилацетатом и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали препаративной HPLC [метод HPLC: колонка: YMC ExRS (250 мм x 21,2 мм, 5 мкм); подвижная фаза А = 10 mM ацетат аммония, pH 4,5, в воде; подвижная фаза В = ацетонитрил; градиент: 80% В в течение 2 минут, затем удерживание при 100 %В в течение 16 минут; скорость потока: 19 мл/мин) с получением соединений 31 и 32.

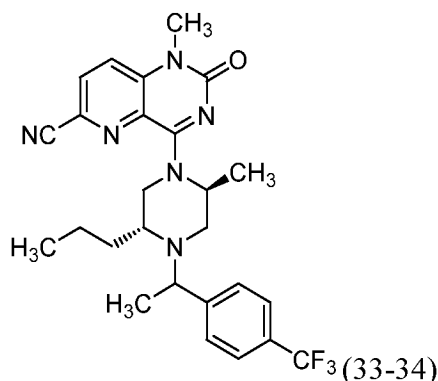
Соединение 31: (10 мг, выход 1,7%), LCMS: m/z = 527,4 ($\text{M}+\text{H}$); t_r 2,626 мин; [метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм), 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc ; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc ; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин)]. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8.30-8.16 (m, 1H), 7.98 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 7.72 (d,

$J = 8.3$ Гц, 2H), 7.56 (br d, $J = 7.8$ Гц, 2H), 5.86-5.44 (m, 1H), 5.01-4.77 (m, 1H), 3.730-3.718 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.43-3.35 (m, 1H), 3.13-3.01 (m, 1H), 2.93-2.75 (m, 2H), 2.38-2.26 (m, 1H), 2.17-1.74 (m, 3H), 1.63-1.22 (m, 3H), 1.01-0.86 (m, 4H), 0.84-0.75 (m, 3H), 0.73-0.54 (m, 3H).

Соединение 32: (7,2 мг, выход 1,23%), LCMS: $m/z = 527,3$ (M+H); rt 2,654 мин; [метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM NH₄OAc; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM NH₄OAc; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин)]. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) $\delta = 8.29$ -8.15 (m, 1H), 7.96-8.02 (m, 1H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Гц, 2H), 7.58 (br d, $J = 8.1$ Гц, 2H), 6.09-5.22 (m, 1H), 5.13-4.66 (m, 1H), 3.68-3.52 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.28-3.04 (m, 2H), 2.60-2.53 (m, 1H), 2.25-2.12 (m, 1H), 2.04-1.68 (m, 3H), 1.60-1.29 (m, 3H), 1.05-0.74 (m, 7H), 0.59 (t, $J = 7.5$ Гц, 3H).

Соединения 33 и 34 DGKi

1-Метил-4-((2S,5R)-2-метил-5-пропил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-2-оксо-1,2 -дигидропиридо[3,2-d]пиримидин-6-карбонитрил



К раствору 6-хлор-1-метил-4-((2S,5R)-2-метил-5-пропил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)пиридо[3,2-d]пиримидин-2(1H)-она (0,1 г, 0,19 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли цианид цинка (0,046 г, 0,39 ммоль), цинк (0,7 мг, 9,8 мкмоль) и триэтиламин (0,1 мл, 0,59 ммоль) с последующим дихлор[9,9-диметил-4,5-бис(дифенилфосфино)ксантен]палладием(II) (0,015 г, 0,02 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь нагревали при 90°C в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (50 мл) и фильтровали через слой Celite®, промывая дополнительным количеством этилацетата (2×50 мл). Фильтрат промывали водой (50 мл), рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном

давлении с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной HPLC (метод HPLC: колонка: YMC EXRS (250 x 19 мм, 5 мкм); подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония в воде с pH ~4,5; подвижная фаза В: ацетонитрил (скорость потока: 20 мл/мин) с получением соединения 33 и соединения 34.

Соединение 33: (13 мг, выход 14%). LCMS: $m/z = 499,3$ $[M+H]^+$; rt 2,376 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм, 2,5 мкм); подвижная фаза А: 95% вода:5% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc ; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc , скорость потока: 1,1 мл/мин, температура: 50°C). 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 8.22 (br d, $J = 8.8$ Гц, 1H), 7.98 (d, $J = 8.8$ Гц, 1H), 7.70-7.72 (m, 2H), 7.59-7.61 (m, 2H), 5.84-5.59 (m, 1H), 5.10-4.67 (m, 1H), 3.91-3.75 (m, 1H), 3.38-3.43 (m, 4H), 2.86-2.70 (m, 2H), 2.47-2.36 (m, 1H), 1.63-1.51 (m, 1H), 1.47-1.18 (m, 8H), 0.9-0.99 (m, 1H), 0.75-0.59 (m, 3H).

Соединение 34: (13 мг, выход 13%); LCMS: $m/z = 499,3$ $[M+H]^+$; rt 2,436 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм, 2,5 мкм); подвижная фаза А: 95% вода: 5% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc ; подвижная фаза В: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 mM NH_4OAc , скорость потока: 1,1 мл/мин, температура: 50°C). 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 8.25 (br d, $J = 2.4$ Гц, 1H), 8.06-7.92 (m, 1H), 7.77-7.65 (m, 2H), 7.65-7.54 (m, 2H), 6.09-5.44 (m, 1H), 5.04-4.68 (m, 1H), 3.81-3.59 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.28-3.13 (m, 1H), 2.52-2.61 (m, 1H), 2.24-2.05 (m, 1H), 1.72-1.48 (m, 2H), 1.47-1.15 (m, 8H), 0.98-0.75 (m, 3H).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ

Фармакологические свойства соединений, описанных в настоящем документе, могут быть подтверждены рядом биологических анализов.

1. Анализы ингибирования DGK in vitro

Реакции $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$ проводили с использованием либо экстрадированной липосомы (анализы LIPGLO $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$), либо субстрата детергент/липидные мицеллы (анализы $DGK\alpha$ и $DGK\zeta$). Реакции проводили в 50 mM MOPS pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 мкМ $CaCl_2$ и 1 mM DTT (аналитический буфер). Реакции с использованием субстрата детергент/липидные мицеллы также содержали 50 mM октил В-D-глюкопиранозид. Концентрации липидного субстрата составляли 11 mM PS и 1 mM DAG для реакций детергент/липидных мицелл. Концентрации липидного субстрата составляли 2 mM PS, 0,25 mM DAG и 2,75 mM PC для реакций с

экструдированными липосомами. Реакции проводили в 150 мкМ АТР. Концентрации фермента для DGK α и DGK ζ составляли 5 нМ.

Исследования ингибирования соединений проводили следующим образом: 50 нл капель каждого тестируемого соединения (максимальная концентрация 10 мМ с 11 точками, серия 3-кратных разведений для каждого соединения), солюбилизированных в DMSO, переносили в лунки белого 1536-луночного планшета (Corning 3725). 5 мл раствора фермент/субстрата с 2х конечной концентрацией реакционной смеси готовили путем объединения 2,5 мл 4х раствора фермента (20 нМ DGK α или DGK ζ (полученного, как описано ниже) в аналитическом буфере) и 2,5 мл 4х липосомального раствора или 4х раствора детергент/липидных мицелл (композиции, описанные ниже) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в лунки, содержащие тестируемое соединение, добавляли 1 мкл 2х фермент/субстратного раствора, и реакции инициировали добавлением 1 мкл 300 мкМ АТР. Реакциям давали протекать в течение 1 часа, после чего добавляли 2 мкл реагента Glo (Promega V9101) и инкубировали в течение 40 минут. Затем добавляли 4 мкл реагента Kinase Detection Reagent и инкубировали в течение 30 минут. Люминесценцию регистрировали с помощью микропланшетного ридера EnVision. Процентное ингибирование рассчитывали по конверсии АТР, вызываемой контрольными реакциями без фермента для 100% ингибирования и реакциями только с носителем для 0% ингибирования. Соединения оценивали при 11 концентрациях для определения IC₅₀.

Получение 4х детергент/липидных мицелл

Детергент/липидную мицеллу получали путем объединения 15 г фосфатидилсерина (Avanti 840035P) и 1 г диацилглицерина (800811O), и растворения в 150 мл хлороформа в 2 л круглодонной колбе. Хлороформ удаляли в высоком вакууме путем роторного испарения. Полученное бесцветное липкое масло ресуспендировали в 400 мл 50 мМ MOPS, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 20 мМ NaF, 10 мМ MgCl₂, 1 мкМ CaCl₂, 1 мМ DTT и 200 мМ октилглюкозида путем интенсивного перемешивания. Липид/детергентный раствор разделяли на аликвоты по 5 мл и хранили при -80°C.

Получение 4х липосом

Липидная композиция содержала 5 мол.% DAG (Avanti 800811O), 40 мол.% PS (Avanti 840035P) и 55 мол.% PC (Avanti 850457) в общей концентрации липидов 15,2 мг/мл для 4х раствора липосом. PC, DAG и PS растворяли в хлороформе, объединяли и

сушили в вакууме до образования тонкой пленки. Липиды гидратировали до 20 мМ в 50 мМ MOPS, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, и пять раз замораживали-оттаивали. Суспензию липидов экстрадировали через 100 нм поликарбонатный фильтр одиннадцать раз. Подтверждение размера липосом (радиус 50-60 нм) проводили методом динамического светорассеяния. Липосомный препарат хранили при 4°C в течение четырех недель.

Бакуловирусная экспрессия DGK α и DGK ζ человека

Образцы бакуловируса человека DGK-альфа-TVMV-His-pFBgate и человеческого DGK-zeta-transcript variant-2-TVMV-His-pFBgate создавали с использованием системы экспрессии бакуловируса Bac-to-Bac (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. ДНК, используемая для экспрессии DGK-альфа и DGK-дзета, имеет SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Амплификацию бакуловируса проводили с использованием инфицированных клеток Sf9 при соотношении вирус/клетка 1:1500 и выращивали в течение 65 часов при 27°C после трансфекции.

Увеличение экспрессии для каждого белка проводили в системе Cellbag 50L WAVE-Bioreactor System 20/50 от GE Healthcare Bioscience. 12 л 2×10^6 клеток/мл клеток Sf9 (Expression System, Davis, CA), выращенных в среде для насекомых ESF921 (Expression System), инфицировали исходным вирусом при соотношении вирус/клетка 1:200 и выращивали в течение 66-68 часов при 27°C после инфицирования. Инфицированную культуру клеток собирали центрифугированием со скоростью 2000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в центрифуге SORVALL® RC12BP. Клеточные осадки хранили при -70°C до очистки.

Очистка человеческих DGK-альфа и DGK-дзета

Полноразмерные человеческие DGK α и DGK ζ , каждый экспрессированный, содержащие расщепляемую TVMV C-концевую последовательность Неха-His tag (SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно), и полученные, как описано выше, очищали из клеточной суспензии насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Клетки лизировали методом кавитации азотом в Азотной бомбе (Parr Instruments) и лизаты осветляли центрифугированием. Осветленные лизаты очищали до ~90% гомогенности с использованием трех последовательных стадий колоночной хроматографии в системе

ÄKTA Purifier Plus. Трехстадийная колоночная хроматография включала захват аффинной смолой на никеле (например, HisTrap FF неочищенный, GE Healthcare) с последующей эксклюзионной хроматографией (например, HiLoad 26/600 Superdex 200 prepgrade, GE Healthcare для DGK-альфа и HiPrep 26/600 Sephacryl S 300_HR, GE Healthcare для DGK-дзета). Третьей стадией была ионообменная хроматография, и она различалась для двух изоформ. DGK-альфа доочищали с помощью анионообменной хроматографии на Q-Sepharose (GE Healthcare). DGK-дзета доочищали с помощью катионообменной хроматографии на SP Sepharose (GE Healthcare). Белки доставляли в концентрациях ≥ 2 мг/мл. Буферы для составления были идентичными для обоих белков: 50 мМ Hepes, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 10% об./об. глицерина, 1 мМ ТСЕР и 0,5 мМ EDTA.

2. Анализ IL2 с использованием CD4 Т-клеток и клеток Raji

Анализ IL-2 в 1536 лунках проводили в объеме 4 мкл с использованием предварительно активированных CD4 Т-клеток и клеток Raji. Перед анализом CD4 Т-клетки предварительно активировали путем обработки α -CD3, α -CD28 и РНА в дозах 1,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно. Клетки Raji обрабатывали стафилококковым энтеротоксином В (SEB) в концентрации 10000 нг/мл. Серийно разведенные соединения сначала переносили в 1536-луночный аналитический планшет (Corning, #3727), затем добавляли 2 мкл предварительно активированных CD4 Т-клеток (конечная плотность 6000 клеток/лунку) и 2 мкл SEB-обработанных клеток Raji (2000 клеток/лунку). После 24-часовой инкубации в инкубаторе при 37°C/5% атмосфере CO₂ в аналитический планшет добавляли 4 мкл реагентов для обнаружения IL-2 (Cisbio, #64IL2PEC). Аналитические планшеты считывали на планшет-ридере Envision. Для оценки цитотоксичности соединения клетки Raji или CD4 Т-клетки инкубировали с серийно разведенными соединениями. После инкубации в течение 24 часов добавляли 4 мкл реагента Cell Titer Glo (Promega, #G7572) и планшеты считывали на планшет-ридере Envision. Рассчитывали 50% эффективную концентрацию (IC₅₀) с использованием четырехпараметрического логистического уравнения $y = A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$, где А и В обозначают минимальный и максимальный % активации или ингибирования, соответственно, С обозначает IC₅₀, D обозначает наклон кривой, и х обозначает концентрацию соединения.

3. Анализ пролиферации CD8 Т-клеток с использованием реагента CellTiter-Glo

Замороженные наивные человеческие CD8 Т-клетки оттаивали в RPMI + 10% FBS, инкубировали в течение 2 ч при 37°C и подсчитывали. 384-Луночный планшет для тканевых культур покрывали в течение ночи при 4°C 20 мкл анти-человеческим CD3 при концентрации 0,1 мкг/мл в чистой среде RPMI, которую удаляли с планшета перед добавлением в каждую лунку 20 к/40 мкл CD8 Т-клеток с 0,5 мкг/мл растворимого анти-человеческого CD28. Соединения переносили на клеточный планшет сразу после посева клеток. После инкубации в течение 72 часов при 37°C в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента CellTiter-glo (номер по каталогу Promega G7570). Планшет интенсивно встряхивали в течение 5 минут, инкубировали при комнатной температуре еще 15 минут и считывали на Envision пролиферацию CD8 Т-клеток. В анализе сигнал CD8 Т-клеток, стимулированный 0,1 мкг/мл анти-CD3 и 0,5 мкг/мл анти-CD28, был фоновым. Эталонное соединение, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил, при 3 мкМ использовали для установки 100% диапазона и EC₅₀ использовали при абсолютном значении 50% для нормализации данных.

4. DGK AP1-Репортерный анализ

Jurkat AP1-luciferase Reporter создавали с использованием набора Signal Lenti AP1 Reporter (luc) от SABiosciences (CLS-011L).

Соединения переносили из планшета Echo LDV в отдельные лунки 384-луночного планшета (белый, со сплошным дном, непрозрачный PE CulturPlate 6007768) с использованием прибора Echo550. Размер пробы составлял 30 нл на лунку; и один конечный планшет на исходный планшет. Суспензию клеток готовили путем переноса 40 мл клеток (2×20 мл) в чистые конические пробирки на 50 мл. Клетки концентрировали центрифугированием (1200 об/мин, 5 мин, температура окружающей среды). Супернатант удаляли и все клетки суспендировали в RPMI (Gibco 11875) + 10% FBS до получения концентрации $1,35 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки добавляли вручную с помощью многоканальной пипетки, 30 мкл/лунку клеточной суспензии в 384-луночный планшет TC, содержащий соединения, $4,0 \times 10^4$ клеток на лунку. Планшеты с клетками инкубировали в течение 20 минут при 37°C и 5% CO₂.

Во время инкубации готовили растворы анти-CD3 антител (α CD3) путем смешивания 3 мкл α CD3 (1,3 мг/мл) с 10 мл среды [конечная концентрация = 0,4 мкг/мл]. Затем 1,5 мкл α CD3 (1,3 мг/мл) смешивали с 0,5 мл среды [конечная концентрация = 4 мкг/мл]. Через 20 минут 10 мкл среды добавляли во все лунки в

колонке 1, лунки с А по М, и 10 мкл α CD3 (4 мкг/мл) на лунку добавляли в колонку 1, ряды с N по Р для сравнения. Затем с помощью многоканальной пипетки добавляли 10 мкл α CD3 (0,4 мкг/мл) на лунку. Клетки, стимулированные α CD3 +/- обработанные соединением, инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов.

В течение этого периода инкубации реагент Steady-Glo (Promega E2520) медленно оттаивали до температуры окружающей среды. Затем добавляли по 20 мкл реагента Steady-Glo на лунку с помощью многокапельного комбинированного дозатора. Пузырьки удаляли центрифугированием (2000 об/мин, температура окружающей среды, 10 сек). Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Образцы оценивали путем измерения относительных световых единиц (RLU) с использованием считывателя планшетов Envision по протоколу люминесценции. Данные анализировали с использованием эталонного соединения, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, для нормализации 100% ингибирования.

5. Анализ мышинных цитотоксических Т-лимфоцитов

Был разработан анализ антиген-специфических цитолитических Т-клеток (CTL) для функциональной оценки способности ингибиторов DGK α и DGK ζ усиливать опосредованную эффекторными Т-клетками активность в отношении уничтожения опухолевых клеток. CD8⁺ Т-клетки, выделенные от трансгенной мыши OT-1, распознают антигенпрезентирующие клетки, MC38, которые презентуют пептид SIINFEKL, происходящий из овальбумина. Распознавание когнатного антигена инициирует цитолитическую активность антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток OT-1.

Функциональные клетки CTL получали следующим образом: спленоциты OT-1 от мышей в возрасте 8-12 недель изолировали и размножали в присутствии пептида SIINFEKL при концентрации 1 мкг/мл и mIL2 при концентрации 10 ЕД/мл. Через три дня добавляли свежую среду с mIL2 ЕД/мл. На 5-й день размножения CD8⁺ Т-клетки были выделены и готовы к использованию. Активированные клетки CTL можно хранить в замороженном виде в течение 6 месяцев. Отдельно один миллион опухолевых клеток MC38 обрабатывали 1 мкг/мл пептида SIINFEKL-OVA в течение 3 часов при 37°C. Клетки промывали (3X) свежей средой для удаления избытка пептида. Наконец, клетки CTL, которые были предварительно обработаны ингибиторами DGK в течение 1 часа в 96-луночном планшете с U-образным дном, объединяли с нагруженными антигеном опухолевыми клетками MC38 в соотношении 1:10. Затем

клетки вращали со скоростью 700 об/мин в течение 5 мин и помещали в инкубатор на ночь при 37°C. Через 24 часа супернатант собирали для анализа уровней цитокинов IFN-гамма с помощью AlphaLisa, приобретенного у Perkin Elmer.

6. Анализ пролиферации PHA

Стимулированные фитогемагглютинином (PHA) бластные клетки из замороженных стоков инкубировали в среде RPMI (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) в течение одного часа перед добавлением в отдельные лунки 384-луночного планшета (10000 клеток на лунку). Соединения переносили в отдельные лунки 384-луночного планшета, и обработанные клетки выдерживали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч в культуральной среде, содержащей человеческий IL2 (20 нг/мл), перед измерением роста с использованием реагента MTS [3-(4,5-диметил-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий] в соответствии с инструкциями производителя (Promega, Madison, WI). Процентную величину ингибирования рассчитывали, сравнивая значения между стимулированным IL2 (0% ингибирование) и нестимулированным контролем (100% ингибирование). Определения ингибирующей концентрации (IC₅₀) рассчитывали на основе 50% ингибирования по кратной индукции между стимулированным IL2 и нестимулированными обработками.

7. Анализ CD8 Т-клеток человека на IFN-гамма

Замороженные наивные человеческие CD8 Т-клетки оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 ч при 37°C и подсчитывали. 384-Луночный планшет для тканевых культур покрывали в течение ночи при 4°C 20 мкл анти-человеческого CD3 при 0,05 мкг/мл в PBS, который удаляли с планшета перед добавлением в каждую лунку 40000 клеток на 40 мкл CD8 Т-клеток с 0,1 мкг/мл растворимого анти-человеческого CD28. Соединения переносили с использованием жидкостного манипулятора Echo на клеточный планшет сразу же после посева клеток. После 20-часовой инкубации при 37°C супернатанты по 3 микролитра на лунку переносили в новый 384-луночный белый планшет для анализа цитокинов.

Количество интерферона-гамма (IFN-гамма) определяли с использованием набора AlphaLISA (Cat#AL217), как описано в руководстве производителя (Perkin Elmer). Подсчеты в каждой лунке переводили в концентрацию IFN-гамма (пг/мл). Значения EC₅₀ соединений определяли путем установки 0,05 мкг/мл анти-CD3 плюс 0,1

мкг/мл анти-CD28 в качестве исходного уровня и совместной стимуляции 3 мкМ эталонного соединения, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, с анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве 100% активации.

8. Анализ CD8 Т-клеток человека на pERK

Замороженные наивные человеческие CD8 Т-клетки оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 часов при 37°C и подсчитывали. Позитивные по CD8 Т-клетки добавляли в 384-луночный планшет для культивирования тканей по 20000 клеток на лунку в среде AIM-V. В каждую лунку добавляли по одному соединению, затем добавляли связанные с шариками моноклональные антитела против CD3 человека и против CD28 человека в конечной концентрации 0,3 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением лизирующего буфера из набора AlphaLISA Surefire kit. (Perkin Elmer, cat# ALSU-PERK-A). Лизат (5 мкл на лунку) переносили в новый 384-луночный белый аналитический планшет для измерения активации pERK.

EC₅₀ соединений определяли как установление анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве исходного уровня и костимуляции 3 мкМ 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве 100% активации.

9. Анализ цельной крови человека на IFN-гамма

Цельную венозную кровь человека (22,5 мкл на лунку), полученную от здоровых доноров, предварительно обрабатывали соединениями в течение одного часа при 37°C во влажном инкубаторе в атмосфере 95% воздуха/5% CO₂. Кровь стимулировали 2,5 мкл mAb против человеческого CD3 и против CD28 в конечной концентрации 1 мкг/мл каждого в течение 24 часов при 37°C. IFN-гамма в супернатантах измеряли с помощью набора AlphaLISA (Cat#AL217).

EC₅₀ соединений определено как установку анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве исходного уровня, и костимуляцию 3 мкМ эталонного соединения, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве 100% активации.

Значения активности ингибирования IC₅₀ DGK in vitro

DGKi Соединен. No.	DGKa LIPGLO IC ₅₀ (мкМ)	DGKz LIPGLO IC ₅₀ (мкМ)	HuCD8 INFG Нормализ. EC ₅₀ (мкМ)	msCTL INFg IC ₅₀ (мкМ)	INFg цельной крови нормализ. агонист EC ₅₀ (мкМ)
1	23	42	-	-	-
2	240	1.7	0.062	0.064	0.52
4	0.98	0.85	0.017	0.043	0.40
5	0.87	1.6	0.030	-	0.68
6	0.66	0.42	0.039	0.033	0.70
7	0.46	0.51	0.047	0.064	0.57
8	15	20	12	-	-
9	4.4	0.97	0.17	-	1.5
10	0.67	0.32	0.023	0.032	0.44
11	0.14	0.57	0.022	-	0.65
12	0.57	0.46	0.048	-	0.44
13	0.15	0.33	0.020	-	0.13
14	1.7	3.7	-	-	-
15	3.4	0.21	-	-	-
16	1.5	0.87	0.0095	0.072	0.52
17	0.16	0.13	-	-	0.02
18	4.66	2.44	-	-	3.75
19	0.39	0.81	-	-	0.52
20	0.12	0.044	-	-	0.032
21	0.094	0.060	-	-	0.043
22	0.099	0.054	-	-	0.020
23	0.15	0.29	-	-	10.48
24	0.32	0.13	-	-	0.20
25	0.067	0.029	-	-	0.015
26	0.014	0.033	-	-	0.090
27	0.19	0.44	-	-	-

28	0.18	0.56	-	-	0.24
29	-	0.038	-	-	-
30	-	0.92	-	-	11.3
31	-	0.039	-	-	-
33	-	0.064	-	-	20
34	-	1.30	-	-	-

В таблице А перечислены значения активности IC₅₀ ингибирования DGK in vitro, измеренные в анализах липосом DGK α и DGK ζ (LIPGLO).

Соединения, описанные в настоящем документе, обладают активностью в качестве ингибитора(ов) одного или обоих ферментов DGK α и DGK ζ и, следовательно, могут быть использованы для лечения заболеваний, связанных с ингибированием активности DGK α и DGK ζ .

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hDGK α -(M1-S735)-Ct-TVMV-His:

```

0001 ATGGCCAAGG AGAGGGGCCT AATAAGCCCC AGTGATTTTG CCCAGCTGCA
0051 AAAATACATG GAATACTCCA CCAAAAAGGT CAGTGATGTC CTAAAGCTCT
0101 TCGAGGATGG CGAGATGGCT AAATATGTCC AAGGAGATGC CATTGGGTAC
0151 GAGGGATTCC AGCAATTCCT GAAAATCTAT CTCGAAGTGG ATAATGTTCC
0201 CAGACACCTA AGCCTGGCAC TGTTTCAATC CTTTGAGACT GGTCACTGCT
0251 TAAATGAGAC AAATGTGACA AAAGATGTGG TGTGTCTCAA TGATGTTTCC
0301 TGCTACTTTT CCCTTCTGGA GGGTGGTCGG CCAGAAGACA AGTTAGAATT
0351 CACCTTCAAG CTGTACGACA CGGACAGAAA TGGGATCCTG GACAGCTCAG
0401 AAGTGGACAA AATTATCCTA CAGATGATGC GAGTGGCTGA ATACCTGGAT
0451 TGGGATGTGT CTGAGCTGAG GCCGATTCTT CAGGAGATGA TGAAAGAGAT
0501 TGA CTATGAT GGCAGTGGCT CTGTCTCTCA AGCTGAGTGG GTCCGGGCTG
0551 GGGCCACCAC CGTGCCACTG CTAGTGCTGC TGGGTCTGGA GATGACTCTG
0601 AAGGACGACG GACAGCACAT GTGGAGGCCC AAGAGGTTCC CCAGACCAGT
0651 CTA CTGCAAT CTGTGCGAGT CAAGCATTGG TCTTGGCAA CAGGGACTGA
0701 GCTGTAACCT CTGTAAGTAC ACTGTTACG ACCAGTGTGC CATGAAAGCC
0751 CTGCCTTGTG AAGTCAGCAC CTATGCCAAG TCTCGGAAGG ACATTGGTGT
0801 CCAATCACAT GTGTGGGTGC GAGGAGGCTG TGAGTCCGGG CGCTGCGACC
0851 GCTGTCAGAA AAAGATCCGG ATCTACCACA GTCTGACCGG GCTGCATTGT
0901 GTATGGTGCC ACCTAGAGAT CCACGATGAC TGCCTGCAAG CGGTGGGCCA
0951 TGAGTGTGAC TGTGGGCTGC TCCGGGATCA CATCCTGCCT CCATCTTCCA
1001 TCTATCCCAG TGTCTGGCC TCTGGACCGG ATCGTAAAAA TAGCAAAACA
1051 AGCCAGAAGA CCATGGATGA TTAAATTTG AGCACCTCTG AGGCTCTGCG

```

1101 GATTGACCCT GTTCCTAACA CCCACCCACT TCTCGTCTTT GTCAATCCTA
 1151 AGAGTGGCGG GAAGCAGGGG CAGAGGGTGC TCTGGAAGTT CCAGTATATA
 1201 TTAAACCCTC GACAGGTGTT CAACCTCCTA AAGGATGGTC CTGAGATAGG
 1251 GCTCCGATTA TTCAAGGATG TTCCTGATAG CCGGATTTTG GTGTGTGGTG
 1301 GAGACGGCAC AGTAGGCTGG ATTCTAGAGA CCATTGACAA AGCTAACTTG
 1351 CCAGTTTTTG CTCCTGTTGC TGTGTTGCCC CTGGGTACTG GAAATGATCT
 1401 GGCTCGATGC CTAAGATGGG GAGGAGGTTA TGAAGGACAG AATCTGGCAA
 1451 AGATCCTCAA GGATTTAGAG ATGAGTAAAG TGGTACATAT GGATCGATGG
 1501 TCTGTGGAGG TGATACCTCA ACAAACTGAA GAAAAAAGTG ACCCAGTCCC
 1551 CTTTCAAATC ATCAATAACT ACTTCTCTAT TGGCGTGGAT GCCTCTATTG
 1601 CTCATCGATT CCACATCATG CGAGAGAAAT ATCCGGAGAA GTTCAACAGC
 1651 AGAATGAAGA ACAAGCTATG GTACTTCGAA TTTGCCACAT CTGAATCCAT
 1701 CTTCTCAACA TGCAAAAAGC TGGAGGAGTC TTTGACAGTT GAGATCTGTG
 1751 GGAAACCGCT GGATCTGAGC AACCTGTCCC TAGAAGGCAT CGCAGTGCTA
 1801 AACATCCCTA GCATGCATGG TGGCTCCAAC CTCTGGGGTG ATACCAGGAG
 1851 ACCCATGGG GATATCTATG GGATCAACCA GGCCTTAGGT GCTACAGCTA
 1901 AAGTCATCAC CGACCCTGAT ATCCTGAAAA CCTGTGTACC AGACCTAAGT
 1951 GACAAGAGAC TGAAGTGGT TGGGCTGGAG GGTGCAATTG AGATGGGCCA
 2001 AATCTATACC AAGCTCAAGA ATGCTGGACG TCGGCTGGCC AAGTGCTCTG
 2051 AGATCACCTT CCACACCACA AAAACCCTTC CCATGCAAAT TGACGGAGAA
 2101 CCCTGGATGC AGACGCCCTG TACAATCAAG ATCACCACA AGAACCAGAT
 2151 GCCCATGCTC ATGGGCCCAC CCCCCGCTC CACCAATTTT TTTGGCTTCT
 2201 TGAGCGGATC CTCGGAGACA GTGCGGTTTC AGGGACACCA CCACCATCAC
 2251 CACTGA

(SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность hDGK α -(M1-S735)-Ct-TVMV-His:

0001 MAKERGLISP SDFALQKYM EYSTKKVSDV LKLFEDGEMA KYVQGDAIGY EGFQQFLKIY 0060
 0061 LEVDNVPRHL SLALFQSFET GHCLNETNVT KDVVCLNDVS CYFSLLEGGR PEDKLEFTFK 0120
 0121 LYDTRNGIL DSSEVDKIIL QMMRVAEYLD WDVSELRPIL QEMMKEIDYD GSGSVSQAEW 0180
 0181 VRAGATTVPL LVLLGLEMTL KDDGQHMWRP KRFRPVYCN LCESSIGLGK QGLSCNLCKY 0240
 0241 TVHDQCAMKA LPCEVSTYAK SRKDIGVQSH VWVRGGCESG RCDRCQKKIR IYHSLTGLHC 0300
 0301 VWCHLEIHDD CLQAVGHECD CGLLRDHILP PSSIYPSVLA SGPDRKNSKT SQKTMDDLNL 0360
 0361 STSEALRIDP VPNTPLLVF VNPKSGGKQG QRVLWKFQYI LNPRQVFNLL KDGPEIGLRL 0420
 0421 FKDVPSRIL VCGGDGTVGW ILETIDKANL PVLPPVAVLP LGTGNDLARC LRWGGGYEGQ 0480
 0481 NLAKILKDLE MSKVVHMDRW SVEVIPQQTE EKSDVPFQI INNYFSIGVD ASIAHRFHIM 0540
 0541 REKYPEKFNS RMKNKLWYFE FATSESI FST CKKLEESLTV EICGKPLDLS NLSLEGIAVL 0600
 0601 NIPSMHGGSN LWGDTRRPHG DIYGINQALG ATAKVITDPD ILKTCVPDLS DKRLEVVGLE 0660

0661 GAIEMGQIYT KLKNAGRRLA KCSEITFHHT KTLPMQIDGE PWMQTPCTIK ITHKNQMPML 0720
 0721 MGPPPRSTNF FGFLSGSSET VRFQGHNNHH H 0751
 (SEQ ID NO: 2)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hDGK ζ - (M1-A928)-transcript variant-2 Ct-TVMV-His:

0001 ATGGAGCCGC GGGACGGTAG CCCCAGAGGCC CGGAGCAGCG ACTCCGAGTC
 0051 GGCTTCCGCC TCGTCCAGCG GCTCCGAGCG CGACGCCGGT CCCGAGCCGG
 0101 ACAAGGCGCC GCGGCGACTC AACAAGCGGC GCTTCCCGGG GCTGCGGCTC
 0151 TTCGGGCACA GGAAAGCCAT CACGAAGTCG GGCCTCCAGC ACCTGGCCCC
 0201 CCCTCCGCCC ACCCCTGGGG CCCCCTGCAG CGAGTCAGAG CGGCAGATCC
 0251 GGAGTACAGT GGAAGGAGC GAGTCAGCGA CATATGGGGA GCACATCTGG
 0301 TTCGAGACCA ACGTGTCCGG GGAATTCTGC TACGTTGGGG AGCAGTACTG
 0351 TGTAGCCAGG ATGCTGCAGA AGTCAGTGTC TCGAAGAAAG TGCGCAGCCT
 0401 GCAAGATTGT GGTGCACACG CCCTGCATCG AGCAGCTGGA GAAGATAAAT
 0451 TTCCGCTGTA AGCCGTCCTT CCGTGAATCA GGCTCCAGGA ATGTCCGCGA
 0501 GCCAACCTTT GTACGGCACC ACTGGGTACA CAGACGACGC CAGGACGGCA
 0551 AGTGTGCGCA CTGTGGGAAG GGATTCCAGC AGAAGTTCAC CTTCCACAGC
 0601 AAGGAGATTG TGGCCATCAG CTGCTCGTGG TGCAAGCAGG CATAACACAG
 0651 CAAGGTGTCC TGCTTCATGC TGCAGCAGAT CGAGGAGCCG TGCTCGCTGG
 0701 GGGTCCACGC AGCCGTGGTC ATCCCGCCCA CCTGGATCCT CCGCGCCCGG
 0751 AGGCCCCAGA ATACTCTGAA AGCAAGCAAG AAGAAGAAGA GGGCATCCTT
 0801 CAAGAGGAAG TCCAGCAAGA AAGGGCCTGA GGAGGGCCGC TGGAGACCCT
 0851 TCATCATCAG GCCCACCCCC TCCCCGCTCA TGAAGCCCCT GCTGGTGTTC
 0901 GTGAACCCCA AGAGTGGGGG CAACCAGGGT GCAAAGATCA TCCAGTCTTT
 0951 CCTCTGGTAT CTCAATCCCC GACAAGTCTT CGACCTGAGC CAGGGAGGGC
 1001 CCAAGGAGGC GCTGGAGATG TACCGCAAAG TGCACAACCT GCGGATCCTG
 1051 GCGTGCGGGG GCGACGGCAC GGTGGGCTGG ATCCTCTCCA CCCTGGACCA
 1101 GCTACGCCTG AAGCCGCCAC CCCCTGTTGC CATCCTGCCC CTGGGTACTG
 1151 GCAACGACTT GGCCCGAACC CTCAACTGGG GTGGGGGCTA CACAGATGAG
 1201 CCTGTGTCCA AGATCCTCTC CCACGTGGAG GAGGGGAACG TGGTACAGCT
 1251 GGACCGCTGG GACCTCCACG CTGAGCCCAA CCCCAGGCA GGGCCTGAGG
 1301 ACCGAGATGA AGGCGCCACC GACCGGTTGC CCCTGGATGT CTTCAACAAC
 1351 TACTTCAGCC TGGGCTTTGA CGCCACGTC ACCCTGGAGT TCCACGAGTC
 1401 TCGAGAGGCC AACCCAGAGA AATTCAACAG CCGCTTTCGG AATAAGATGT
 1451 TCTACGCCGG GACAGCTTTC TCTGACTTCC TGATGGGCAG CTCCAAGGAC
 1501 CTGGCCAAGC ACATCCGAGT GGTGTGTGAT GGAATGGACT TGACTCCCAA
 1551 GATCCAGGAC CTGAAACCCC AGTGTGTTGT TTTCTGAAC ATCCCCAGGT
 1601 ACTGTGCGGG CACCATGCCC TGGGGCCACC CTGGGGAGCA CCACGACTTT

1651 GAGCCCCAGC GGCATGACGA CGGCTACCTC GAGGTCATTG GCTTCACCAT
 1701 GACGTCGTTG GCCGCGCTGC AGGTGGGCGG ACACGGCGAG CGGCTGACGC
 1751 AGTGTGCGCA GGTGGTGCTC ACCACATCCA AGGCCATCCC GGTGCAGGTG
 1801 GATGGCGAGC CCTGCAAGCT TGCAGCCTCA CGCATCCGCA TCGCCCTGCG
 1851 CAACCAGGCC ACCATGGTGC AGAAGGCCAA GCGGCGGAGC GCCGCCCCC
 1901 TGCACAGCGA CCAGCAGCCG GTGCCAGAGC AGTTGCGCAT CCAGGTGAGT
 1951 CGCGTCAGCA TGCACGACTA TGAGGCCCTG CACTACGACA AGGAGCAGCT
 2001 CAAGGAGGCC TCTGTGCCGC TGGGCACTGT GGTGGTCCCA GGAGACAGTG
 2051 ACCTAGAGCT CTGCCGTGCC CACATTGAGA GACTCCAGCA GGAGCCCGAT
 2101 GGTGCTGGAG CCAAGTCCCC GACATGCCAG AAAGTGTCCC CCAAGTGGTG
 2151 CTCCTGGAC GCCACCACTG CCAGCCGCTT CTACAGGATC GACCGAGCCC
 2201 AGGAGCACCT CAACTATGTG ACTGAGATCG CACAGGATGA GATTTATATC
 2251 CTGGACCCTG AGCTGCTGGG GGCATCGGCC CGGCCTGACC TCCCAACCCC
 2301 CACTTCCCCT CTCCCCACCT CACCCTGCTC ACCCACGCCC CGGTCACTGC
 2351 AAGGGGATGC TGCACCCCCT CAAGGTGAAG AGCTGATTGA GGCTGCCAAG
 2401 AGGAACGACT TCTGTAAGCT CCAGGAGCTG CACCGAGCTG GGGGCGACCT
 2451 CATGCACCGA GACGAGCAGA GTCGCACGCT CCTGCACCAC GCAGTCAGCA
 2501 CTGGCAGCAA GGATGTGGTC CGCTACCTGC TGGACCACGC CCCCCAGAG
 2551 ATCCTTGATG CGGTGGAGGA AAACGGGGAG ACCTGTTTGC ACCAAGCAGC
 2601 GGCCCTGGGC CAGCGCACCA TCTGCCACTA CATCGTGGAG GCCGGGGCCT
 2651 CGCTCATGAA GACAGACCAG CAGGGCGACA CTCCCCGGCA GCGGGCTGAG
 2701 AAGGCTCAGG ACACCGAGCT GGCCGCCTAC CTGGAGAACC GGCAGCACTA
 2751 CCAGATGATC CAGCGGGAGG ACCAGGAGAC GGCTGTGGGA TCCTCGGAGA
 2801 CAGTGCGGTT TCAGGGACAC CACCACCATC ACCACTGA

(SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность hDGK ζ -(M1-A928)-transcript variant-2 Ct-TVMV-His:

0001 MEPRDGSPEA RSSDSESASA SSSGSERDAG PEPDKAPRRL NKRRFPGLRL FGHRKAITKS 0060
 0061 GLQHLAPPPP TPGAPCSESE RQIRSTVDWS ESATYGEHIW FETNVSGDFC YVGEQYCVAR 0120
 0121 mLQKSVSRRK CAACKIVVHT PCIEQLEKIN FRCKPSFRES GSRNVREPTF VRHHWVHRRR 0180
 0181 QDGKCRHCGK GFQQKFTFHS KEIVAIKCSW CKQAYHSKVS CFMLQQIEEP CSLGVHAAVV 0240
 0241 IPPTWILRAR RPQNTLKASK KKKRASFKRK SSKKGPEEGR WRPFIIRPTP SPLMKPLLVF 0300
 0301 VNPKSGGNQG AKIIQSFLWY LNPRQVFDLS QGGPKAELEM YRKVHNLRIL ACGGDGTVGW 0360
 0361 ILSTLDQLRL KPPPPVAILP LGTGNLART LNWGGGYTDE PVS KILSHVE EGNVVQLDRW 0420
 0421 DLHAEPNPEA GPEDRDEGAT DRLPLDVFN YFSLGFDAHV TLEFHESREA NPEKFNSRFR 0480
 0481 NKMFYAGTAF SDFLMGSSKD LAKHIRVVCD GMDLTPKIQD LKPQCVVFLN IPRYCAGTMP 0540
 0541 WGHPEHHDF EPQRHDDGYL EVIGFTMTSL AALQVGGHGE RLTQCREVVL TTSKAI PVQV 0600
 0601 DGEPCKLAAS RIRIALRNQA TMVQKAKRRS AAPLHSDQQP VPEQLRIQVS RVSMHDYEAL 0660

0661 HYDKEQLKEA SVPLGTVVVP GSDLELCRA HIERLQQEPD GAGAKSPTCQ KLSPKWCFLD 0720
0721 ATTASRFYRI DRAQEHLNYV TEIAQDEIYI LDPELLGASA RPDLPPTPTSP LPTSPCSPTP 0780
0781 RSLQGDAAPP QGEELIEAAK RNDFCKLQEL HRAGGDLMHR DEQSRTLLHH AVSTGSKDVV 0840
0841 RYLLDHAPPE ILDAVEENGE TCLHQAAALG QRTICHYIVE AGASLMKTDQ QGDTPRQRAE 0900
0901 KAQDTELAAY LENRQHYQMI QREDQETAVG SSETVRFQGH HHHHH 0945

(SEQ ID NO: 4)

Формула изобретения

1. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора DGK α и/или DGK ζ и антагониста оси PD1/PD-L1.
2. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора DGK α и/или DGK ζ и антагониста CTLA4.
3. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора DGK α и/или DGK ζ , антагониста оси PD1/PD-L1 и антагониста CTLA4.
4. Способ по любому из пп. 1-3, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ человека представляет собой ингибитор DGK α и не значительный ингибитор DGK ζ .
5. Способ по любому из пп. 1-3, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой ингибитор DGK ζ и не значительный ингибитор DGK α .
6. Способ по любому из пп. 1-5, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой ингибитор DGK α и DGK ζ .
7. Способ по любому из пп. 1-6, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ не является значительным ингибитором других DGK.
8. Способ по любому из пп. 1 и 3-7, где антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антагонист PD1, например, PD1 человека.
9. Способ по п. 8, где антагонист PD-1 представляет собой ниволумаб, пембролизумаб или любой другой антагонист PD-1, описанный в настоящем документе.
10. Способ по любому из пп. 1 и 3-7, где антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антагонист PD-L1, такой как PD-L1 человека.

11. Способ по п. 10, где антагонист PD-L1 представляет собой атезолизумаб или любой другой антагонист PD-L1, описанный в настоящем документе.

12. Способ по любому из пп. 2-11, где антагонист CTLA4 представляет собой ипилимумаб или любой другой антагонист CTLA4, описанный в настоящем документе.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где антагонист DGK α и/или DGK ζ усиливает первичную передачу сигналов Т-клетками, о чем свидетельствует, например, усиление передачи сигналов pERK/pPKC.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ снижает порог стимуляции антигеном; снижает требования к аффинности и/или снижает требования к концентрации антигена для распознавания и активации Т-клеточного антигена.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ повышает эффекторную функцию CTL.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает уничтожение опухолевых клеток.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где противоопухолевая активность ингибитора DGK α и/или DGK ζ зависит от CD8⁺ Т-клеток в животной модели CT26.

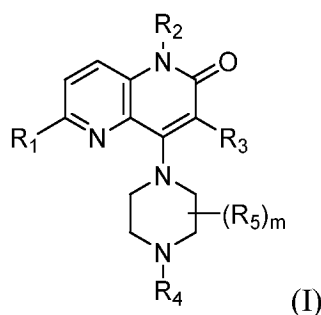
18. Способ по любому из пп. 1-17, где противоопухолевая активность ингибитора DGK α и/или DGK ζ зависит от NK-клеток в животной модели CT26.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где противоопухолевая активность ингибитора DGK α и/или DGK ζ усиливается за счет истощения клеток CD4 в животной модели CT-26.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ усиливает представление антигена тетрамера AH1⁺ в животной модели CT-26 или

преодолевают снижение уровней В2М для восстановления эффекторной функции Т-клеток.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R₁ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{3–4}

циклоалкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{1–3} алкокси, замещенный 0–4 R_{1a}, –NR_aR_a,
–S(O)_nR_e или –P(O)R_eR_e;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –OCH₃ или –NR_aR_a;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1–3} алкил;

каждый R_e независимо представляет собой C_{3–4} циклоалкил или C_{1–3} алкил,
замещенный 0–4 R_{1a};

R₂ представляет собой H, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{2a}, или C_{3–4} циклоалкил,
замещенный 0–4 R_{2a};

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –O(C_{1–2} алкил), C_{3–4}
циклоалкил, C_{3–4} алкенил или C_{3–4} алкинил;

R₃ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1–3} алкил, C_{1–2} фторалкил, C_{3–4} циклоалкил,
C_{3–4} фторциклоалкил или –NO₂;

R₄ представляет собой –CH₂R_{4a}, –CH₂CH₂R_{4a}, –CH₂CHR_{4a}R_{4d}, –CHR_{4a}R_{4b} или
–CR_{4a}R_{4b}R_{4c};

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) C_{1–6} алкил, замещенный 0–4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl,
–CN, –OH, –OCH₃, –SCH₃, C_{1–3} фторалкокси, –NR_aR_a, –S(O)₂R_e или –NR_aS(O)₂R_e;
- (ii) C_{3–6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый замещенный 0–4
заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1–6} алкила, C_{1–3}

фторалкила, C_{1-4} гидроксialкила, $-(CH_2)_{1-2}O(C_{1-3} \text{ алкила})$, C_{1-4} алкокси, $-O(C_{1-4} \text{ гидроксialкила})$, $-O(CH)_{1-3}O(C_{1-3} \text{ алкила})$, C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH)_{1-3}NR_cR_c$, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-C(O)(C_{1-4} \text{ алкила})$, $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4} \text{ алкила})$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)O(C_{1-4} \text{ алкила})$, $-P(O)(C_{1-3} \text{ алкила})_2$, $-S(O)_2(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-O(CH_2)_{1-2}(C_{3-6} \text{ циклоалкила})$, $-O(CH_2)_{1-2}(\text{морфолинила})$, циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (*трет*-бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d ; или

(iii) C_{1-4} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)(C_{1-3} \text{ алкила})$, $-NR_aC(O)O(C_{1-4} \text{ алкила})$ и C_{3-6} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкил, C_{1-3} фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

R_{4d} представляет собой $-OCH_3$;

каждый R_c независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, $-CN$, $-CH_3$ и $-OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4}

алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридилил, замещенный 0-4 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил); каждый R_g представляет собой независимо F, Cl, $-CN$, $-OH$, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкил) или $-NR_cR_c$; m равен 0, 1, 2 или 3; и n равен 0, 1 или 2.

22. Способ по п. 21, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где: R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-CN$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , циклопропил, замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ или $-P(O)(CH_3)_2$; каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl или $-CN$; каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1-3} алкил; R_2 представляет собой H или C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} ; каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-CN$, $-OH$, $-O(C_{1-2}$ алкил), циклопропил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил; R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, $-CN$, C_{1-2} алкил, $-CF_3$, циклопропил или $-NO_2$; R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) C_{1-4} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-CN$, $-OH$, $-OCH_3$, $-SCH_3$, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_aR_a$;
- (ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-CN$, $-OH$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, $-CH_2OH$, $-(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-O(C_{1-4}$ гидроксialкила), $-O(CH)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH)_{1-2}NR_cR_c$, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-C(O)(C_{1-4}$ алкила), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-P(O)(C_{1-2}$ алкила) $_2$, $-S(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-O(CH_2)_{1-2}(C_{3-4}$ циклоалкила),

–O(CH₂)_{1–2}(морфолинила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d; или

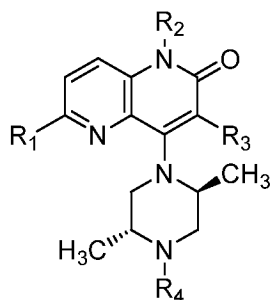
(iii) C_{1–3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3–6} циклоалкила, гетероциклила, фенила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0–3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –OH, –CN, C_{1–3} алкила, C_{1–2} фторалкила, C_{1–3} алкокси, C_{1–2} фторалкокси, –OCH₂CH=CH₂, –OCH₂C≡CH, –NR_cR_c, –NR_aS(O)₂(C_{1–3} алкила), –NR_aC(O)(C_{1–3} алкила), –NR_aC(O)O(C_{1–4} алкила) и C_{3–4} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3–6} циклоалкил или 3–6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0–3 R_f; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, –OH, –CN, C_{1–4} алкил, C_{1–2} фторалкил, C_{1–3} алкокси, C_{1–2} фторалкокси, –OCH₂CH=CH₂, –OCH₂C≡CH, –NR_cR_c, или циклическую группу, выбранную из C_{3–6} циклоалкила, 3–6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0–3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –OH, –CN, C_{1–4} алкила, C_{1–2} фторалкила, C_{1–3} алкокси, C_{1–2} фторалкокси и –NR_cR_c;

R_{4c} представляет собой C_{1–4} алкил или C_{3–6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0–4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –OH, C_{1–2} алкокси, C_{1–2} фторалкокси и –CN;

и каждый R₅ независимо представляет собой –CN, C_{1–5} алкил, замещенный 0–4 R_g, C_{2–3} алкенил, замещенный 0–4 R_g, C_{2–3} алкинил, замещенный 0–4 R_g, C_{3–4} циклоалкил, замещенный 0–4 R_g, фенил, замещенный 0–3 R_g, оксадиазол, замещенный 0–3 R_g, пиридинил, замещенный 0–3 R_g, –(CH₂)_{1–2}(гетероциклил, замещенный 0–4 R_g), –(CH₂)_{1–2}NR_cC(O)(C_{1–4} алкил), –(CH₂)_{1–2}NR_cC(O)O(C_{1–4} алкил), –(CH₂)_{1–2}NR_cS(O)₂(C_{1–4} алкил), –C(O)(C_{1–4} алкил), –C(O)OH, –C(O)O(C_{1–4} алкил), –C(O)O(C_{3–4} циклоалкил), –C(O)NR_aR_a или –C(O)NR_a(C_{3–4} циклоалкил).

23. Способ по п. 22, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее структуру:



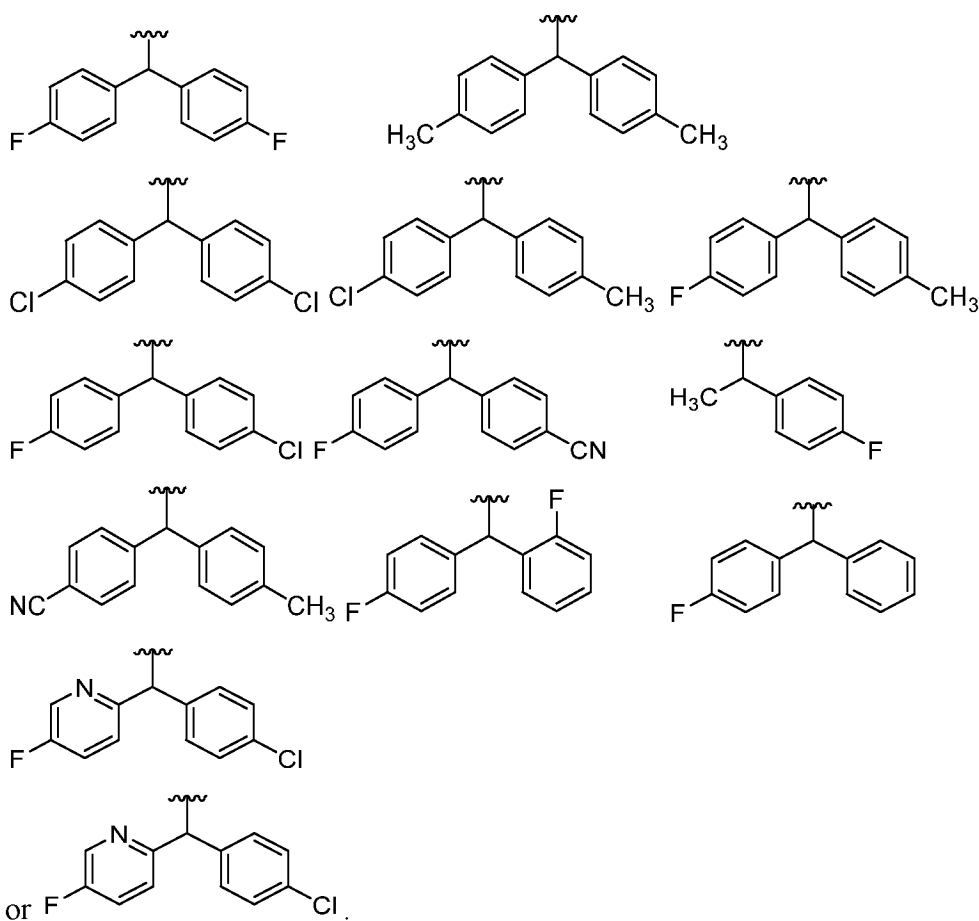
где:

R₁ представляет собой -CN;

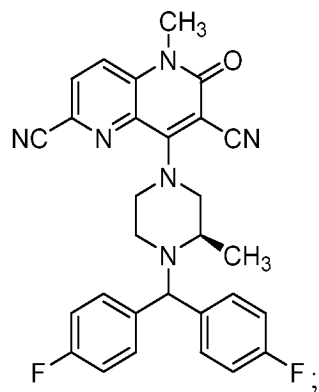
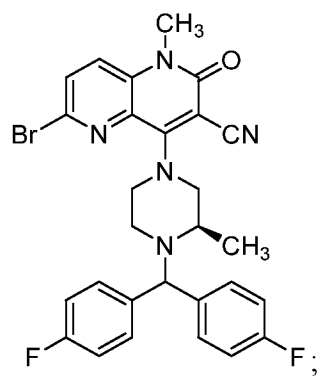
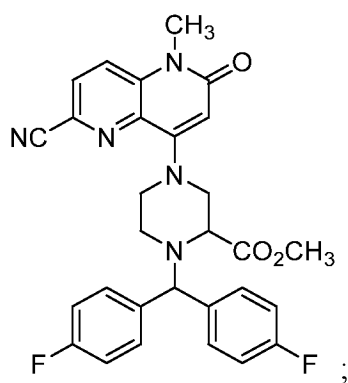
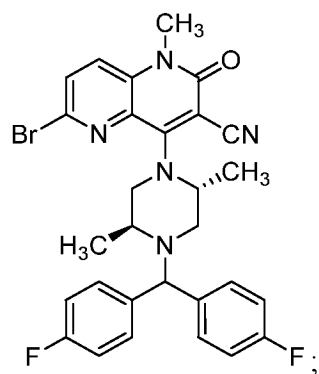
R₂ представляет собой -CH₃;

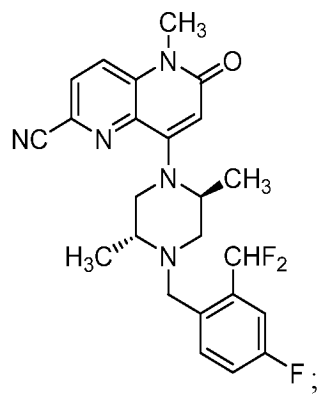
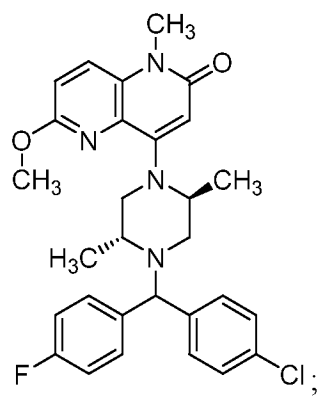
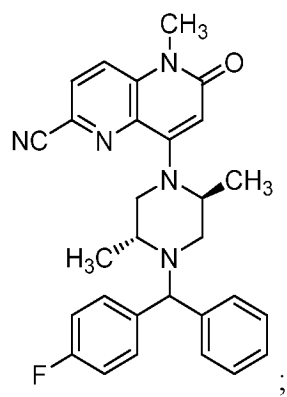
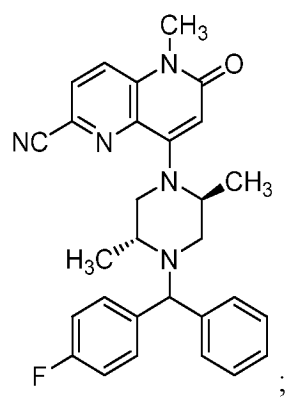
R₃ представляет собой H, F или -CN;

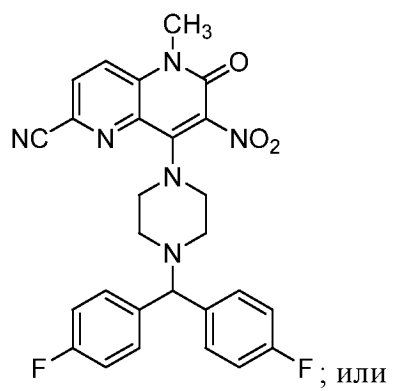
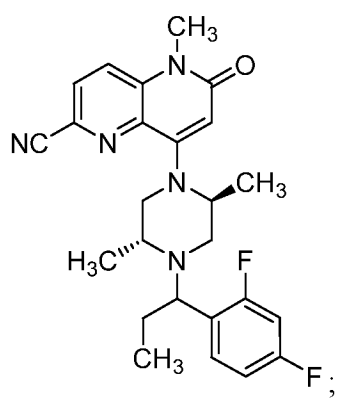
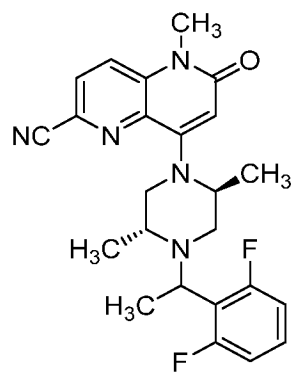
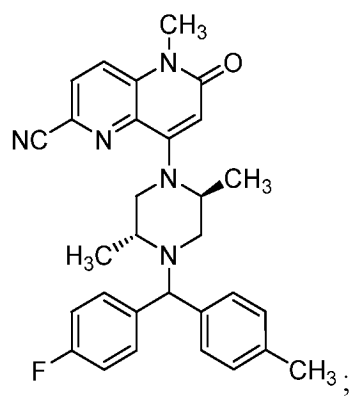
R₄ представляет собой:

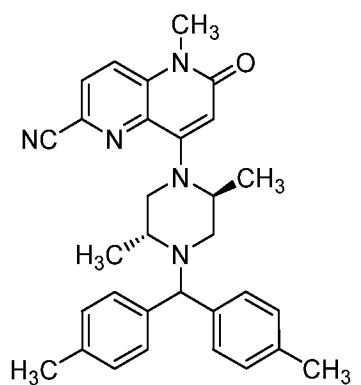


24. Способ по п. 21, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее структуру:

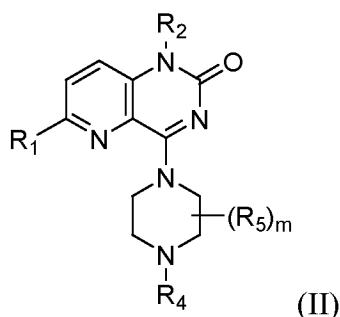








25. Способ по любому из пп. 1–20, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой соединение формулы (II):



или его соль, где:

R₁ представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{3–4} циклоалкил, замещенный 0–4 R_{1a}, C_{1–3} алкокси, замещенный 0–4 R_{1a}, –NR_aR_a, –S(O)_nR_c или –P(O)R_cR_c;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –OCH₃ или –NR_aR_a;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1–3} алкил;

каждый R_c независимо представляет собой C_{3–4} циклоалкил или C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{1a};

R₂ представляет собой H, C_{1–3} алкил, замещенный 0–4 R_{2a}, или C_{3–4} циклоалкил, замещенный 0–4 R_{2a};

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, –O(C_{1–2} алкил), C_{3–4} циклоалкил, C_{3–4} алкенил или C_{3–4} алкинил;

R₄ представляет собой –CH₂R_{4a}, –CH₂CH₂R_{4a}, –CH₂CHR_{4a}R_{4d}, –CHR_{4a}R_{4b} или –CR_{4a}R_{4b}R_{4c};

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

(i) –CN или C_{1–6} алкил, замещенный 0–4 заместителями, независимо выбранными из

F, Cl, -CN, -OH, -OCH₃, -SCH₃, C₁₋₃ фторалкокси, -NR_aR_a, -S(O)₂R_e или -NR_aS(O)₂R_e;

- (ii) C₃₋₆ циклоалкил, 4-10-членный гетероцикл, фенил или 5-10-членный гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -CN, -OH, C₁₋₆ алкила, C₁₋₃ фторалкила, C₁₋₂ бромалкила, C₁₋₂ цианоалкила, C₁₋₄ гидроксиалкила, -(CH₂)₁₋₂O(C₁₋₃ алкила), C₁₋₄ алкокси, C₁₋₃ фторалкокси, C₁₋₃ цианоалкокси, -O(C₁₋₄ гидроксиалкила), -O(CR_xR_x)₁₋₃O(C₁₋₃ алкила), C₁₋₃ фторалкокси, -O(CH₂)₁₋₃NR_cR_c, -OCH₂CH=CH₂, -OCH₂C≡CH, -C(O)(C₁₋₄ алкила), -C(O)OH, -C(O)O(C₁₋₄ алкила), -NR_cR_c, -CH₂NR_aR_a, -NR_aS(O)₂(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)(C₁₋₃ алкила), -(CR_xR_x)₀₋₂NR_aC(O)O(C₁₋₄ алкила), -P(O)(C₁₋₃ алкила)₂, -S(O)₂(C₁₋₃ алкила), -(CR_xR_x)₁₋₂(C₃₋₄ циклоалкила), -(CR_xR_x)₁₋₂(морфолинила), -(CR_xR_x)₁₋₂(диформорфолинила), -(CR_xR_x)₁₋₂(диметилморфолинила), -(CR_xR_x)₁₋₂(оксазабицикло[2.2.1]гептанила), (CR_xR_x)₁₋₂(оксазаспиро[3.3]гептанила), -(CR_xR_x)₁₋₂(метилпиперазинонила), -(CR_xR_x)₁₋₂(ацетилпиперазинонила), -(CR_xR_x)₁₋₂(пиперидинида), -(CR_xR_x)₁₋₂(дифторпиперидинида), -(CR_xR_x)₁₋₂(метоксипиперидинида), -(CR_xR_x)₁₋₂(гидроксипиперидинида), -O(CR_xR_x)₀₋₂(C₃₋₆ циклоалкила), -O(CR_xR_x)₀₋₂(метилциклопропила), -O(CR_xR_x)₀₋₂((этоксикарбонил)циклопропила), -O(CR_xR_x)₀₋₂(оксетанила), -O(CR_xR_x)₀₋₂(метилазетидинида), -O(CR_xR_x)₀₋₂(тетрагидропирианида), -O(CR_xR_x)₁₋₂(морфолинида), -O(CR_xR_x)₀₋₂(триазилида), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинида, ацетилазетидинида, (трет-бутоксикарбонил)азетидинида, триазилида, тетрагидропирианида, морфолинида, тиофенила, метилпиперидинида, диоксоланила, пирролидинонила и R_d; или
- (iii) C₁₋₄ алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C₃₋₆ циклоалкила, 4-10-членного гетероцикла, моно или бициклического арила или 5-10-членного гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C₁₋₆ алкила, C₁₋₃ фторалкила, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₃ фторалкокси, -OCH₂CH=CH₂, -OCH₂C≡CH, -NR_cR_c, -NR_aS(O)₂(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)O(C₁₋₄ алкила) и C₃₋₆ циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкил, C_{1-3}

фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-OH$, $-CN$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-OH$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-CN$;

R_{4d} представляет собой $-OCH_3$;

каждый R_c независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, $-CN$, $-CH_3$ и $-OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой $-CN$, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-4 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (4-10-членный гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил);

каждый R_g независимо представляет собой F, Cl, $-CN$, $-OH$, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкил) или $-NR_cR_c$;

m равно 0, 1, 2 или 3; и

n равно 0, 1 или 2.

26. Способ по п. 25, где ингибитор $DGK\alpha$ и/или $DGK\zeta$ представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-CN$, $-OH$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} ,

циклопропил, замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-NR_aR_a$,

$-\text{S}(\text{O})_n\text{CH}_3$ или $-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$;

R_2 представляет собой H или C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} ;

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкил),

циклопропил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

(i) $-\text{CN}$ или C_{1-4} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси и $-\text{NR}_a\text{R}_a$;

(ii) C_{3-6} циклоалкил, 4-10-членный гетероцикл, фенил или 5-10-членный гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-2} бромалкила, C_{1-2} цианоалкила, C_{1-2} гидроксиалкила, $-\text{CH}_2\text{NR}_a\text{R}_a$, $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкила), $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{NR}_x\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-\text{O}(\text{C}_{1-4}$ гидроксиалкила), $-\text{O}(\text{CR}_x\text{R}_x)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, C_{1-3} цианоалкокси, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_{1-2}$ алкила) $_2$, $-\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{C}_{3-4}$ циклоалкила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (морфолинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (дифторморфолинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (диметилморфолинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (оксаазабицикло[2.2.1]гептанила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (оксаазаспиро[3.3]гептанила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (метилпиперазинонила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (ацетилпиперазинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (пиперидинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (дифторпиперидинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (метоксипиперидинила), $-\text{CR}_x\text{R}_x$ (гидроксипиперидинила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}(\text{C}_{3-4}$ циклоалкила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (метилциклопропила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (этоксикарбонил)циклопропила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (оксетанила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (метилазетидинила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}$ (морфолинила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (тетрагидропиранила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-2}$ (тиазолила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, диоксоланила, пирролидинонила, триазолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила, и R_d ; или

(iii) C_{1-3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, 4-10-членного гетероцикла, моно- или бициклического арила или 5-10-членного гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3

заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –OH, –CN, C₁₋₃ алкила, C₁₋₂ фторалкила, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₂ фторалкокси, –OCH₂CH=CH₂, –OCH₂C≡CH, –NR_cR_c, –NR_aS(O)₂(C₁₋₃ алкила), –NR_aC(O)(C₁₋₃ алкила), –NR_aC(O)O(C₁₋₄ алкила) и C₃₋₄ циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C₃₋₆ циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f, каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, –OH, –CN, C₁₋₄ алкил, C₁₋₂ фторалкил, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₂ фторалкокси, –OCH₂CH=CH₂, –OCH₂C≡CH, –NR_cR_c или циклическую группу, выбранную из C₃₋₆ циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –OH, –CN, C₁₋₄ алкила, C₁₋₂ фторалкила, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₂ фторалкокси и –NR_cR_c;

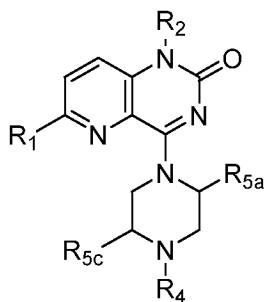
R_{4c} представляет собой C₁₋₄ алкил или C₃₋₆ циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –OH, C₁₋₂ алкокси, C₁₋₂ фторалкокси и –CN;

каждый R₅ независимо представляет собой –CN, C₁₋₅ алкил, замещенный 0-4 R_g, C₂₋₃ алкенил, замещенный 0-4 R_g, C₂₋₃ алкинил, замещенный 0-4 R_g, C₃₋₄ циклоалкил, замещенный 0-4 R_g, фенил, замещенный 0-3 R_g, оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g, пиридилил, замещенный 0-3 R_g, –(CH₂)₁₋₂(4-10-членный гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), –(CH₂)₁₋₂NR_cC(O)(C₁₋₄ алкил), –(CH₂)₁₋₂NR_cC(O)O(C₁₋₄ алкил), –(CH₂)₁₋₂NR_cS(O)₂(C₁₋₄ алкил), –C(O)(C₁₋₄ алкил), –C(O)OH, –C(O)O(C₁₋₄ алкил), –C(O)O(C₃₋₄ циклоалкил), –C(O)NR_aR_a или –C(O)NR_a(C₃₋₄ циклоалкил);

каждый R_x независимо представляет собой H или –CH₃; и

m равно 1, 2 или 3.

27. Способ по п. 26, где ингибитор DGKα и/или DGKζ представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее структуру:



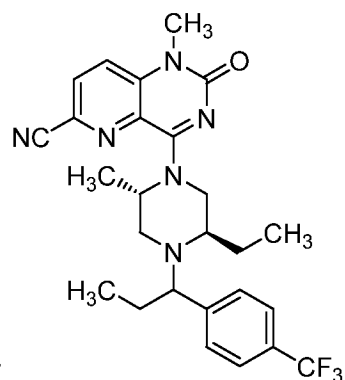
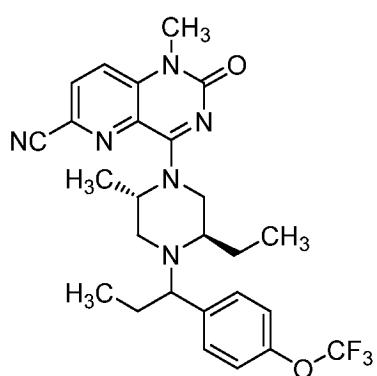
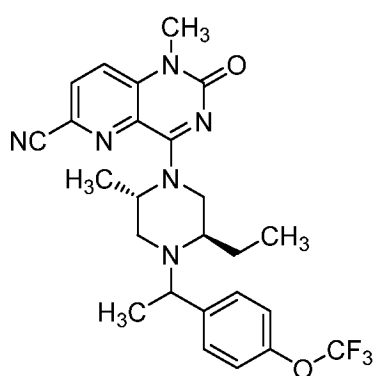
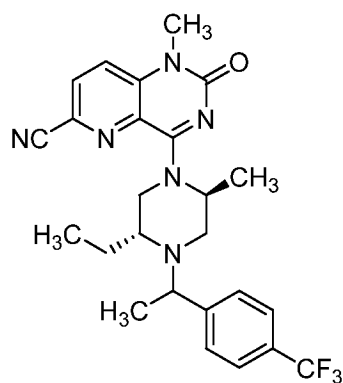
R₁ представляет собой –CN;

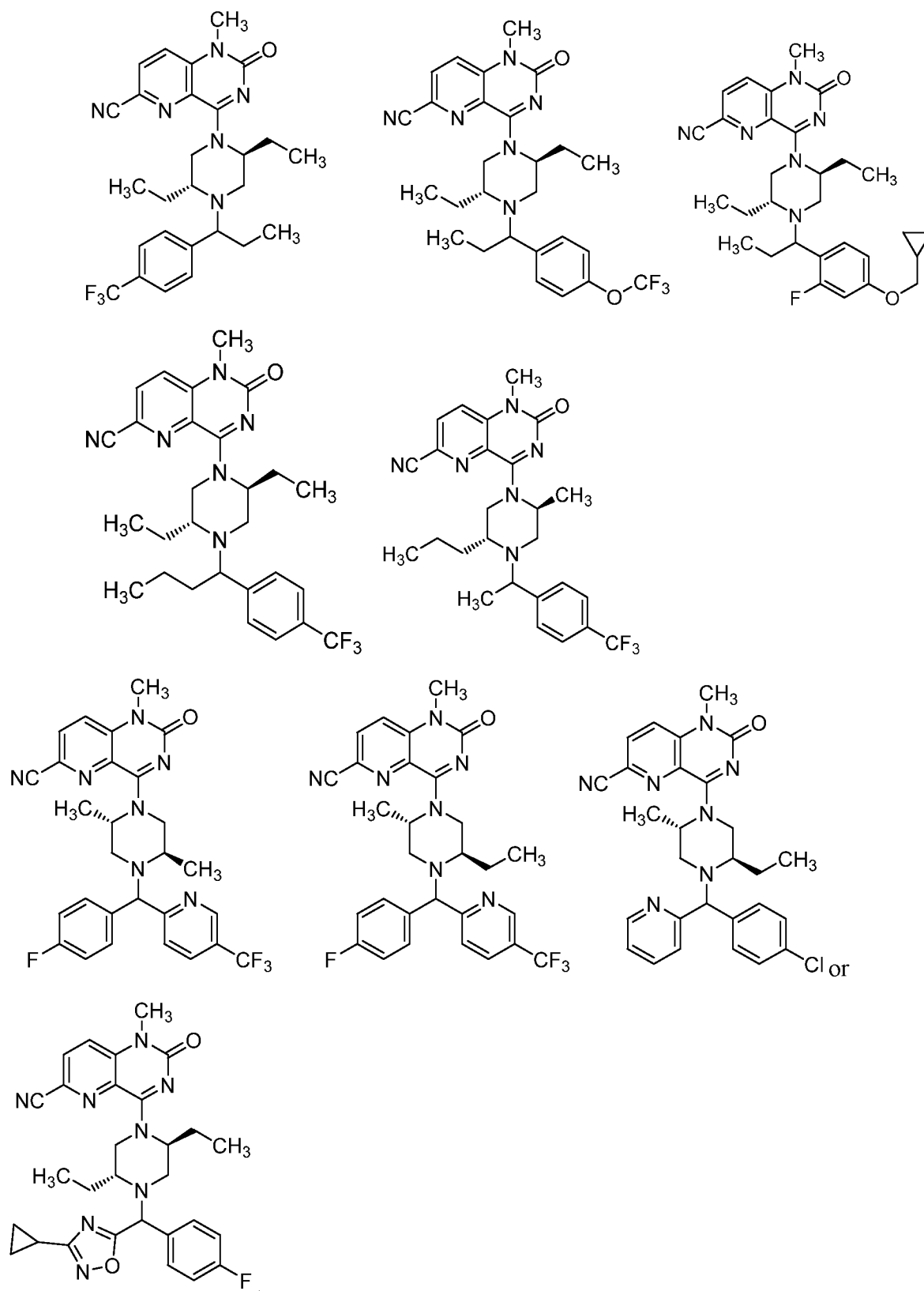
R₂ представляет собой –CH₃;

R_{5a} представляет собой –CH₃ или –CH₂CH₃; и

R_{5c} представляет собой –CH₃, –CH₂CH₃ или –CH₂CH₂CH₃.

28. Способ по п. 25, где ингибитор DGKα и/или DGKζ представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, имеющее структуру:





29. Способ по любому из пп. 1-28, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическую (жидкую) опухоль.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где рак выбран из группы видов рака, описанных в настоящем документе.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где способ включает проведение одного или нескольких других методов лечения рака.

32. Способ по п. 31, где один или несколько других методов лечения рака включают облучение, хирургическое вмешательство, химиотерапию или введение биологического препарата.

33. Способ по п. 31, где одно или несколько других средств лечения рака представляют собой введение биологического лекарственного средства, и биологическое лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, стимулирующее иммунную систему.

34. Способ по любому из пп. 1-30, где указанный способ не включает введение другого средства для лечения рака во время лечения ингибитором DGK α и/или DGK ζ , антагонистом оси PD1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA4.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где субъект не подвергался лечению антагонистом оси PD1/PD-L1 или антагонистом CTLA4 до введения ингибитора DGK α и/или DGK ζ , антагониста оси PD1/PD-L1 и/или антагониста CTLA4.

36. Способ по п. 35, включающий введение субъекту ингибитора DGK α и/или DGK ζ , антагониста оси PD1/PD-L1 и антагониста CTLA4.

37. Способ по любому из пп. 1-34, где субъект является резистентным или рефрактерным к лечению антагонистом ингибитора контрольной точки, таким как антагонист оси PD1/PD-L1 и/или антагонист CTLA4.

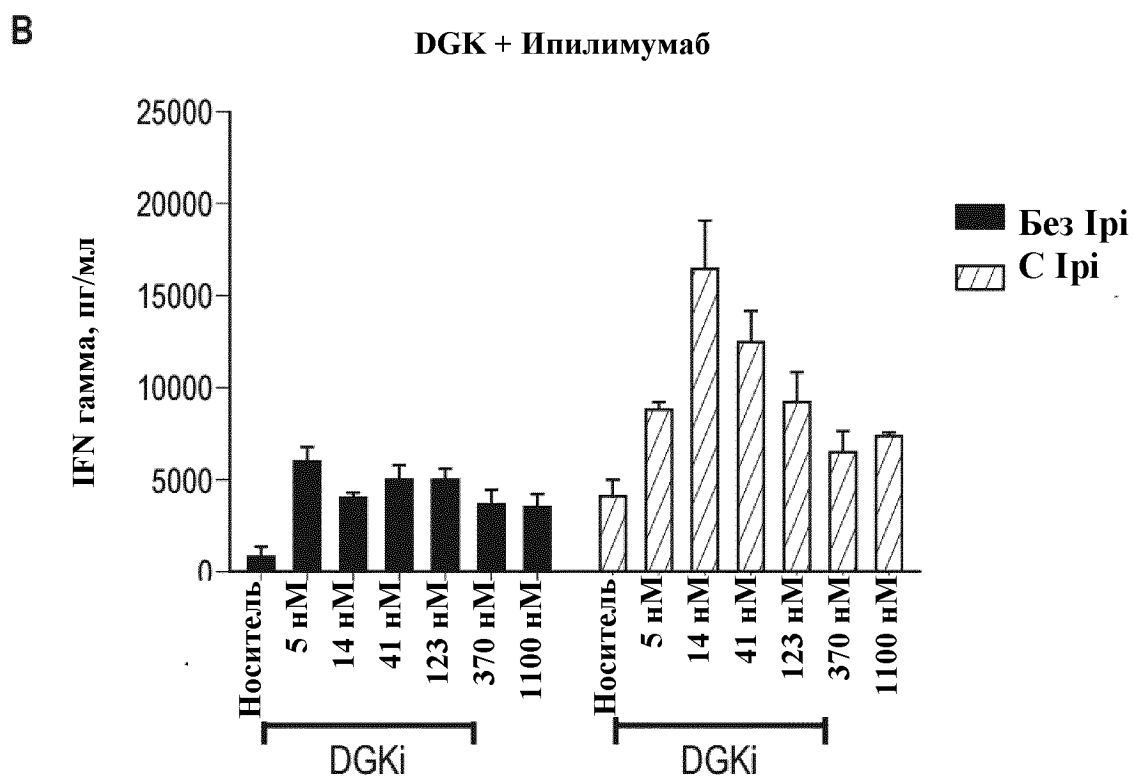
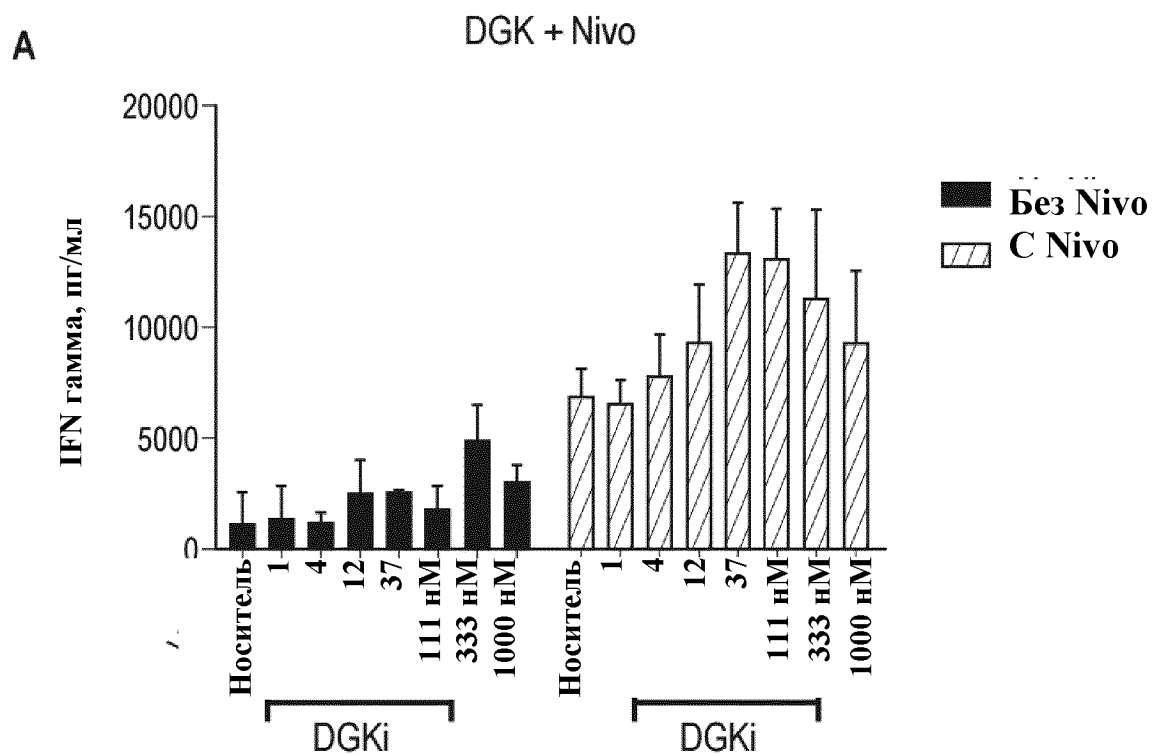
38. Способ по п. 37, включающий введение субъекту ингибитора DGK α и/или DGK ζ , антагониста оси PD1/PD-L1 и антагониста CTLA4.

39. Способ по п. 21 или 25, включающий введение субъекту антагониста оси PD1/PD-L1 и антагониста CTLA4.

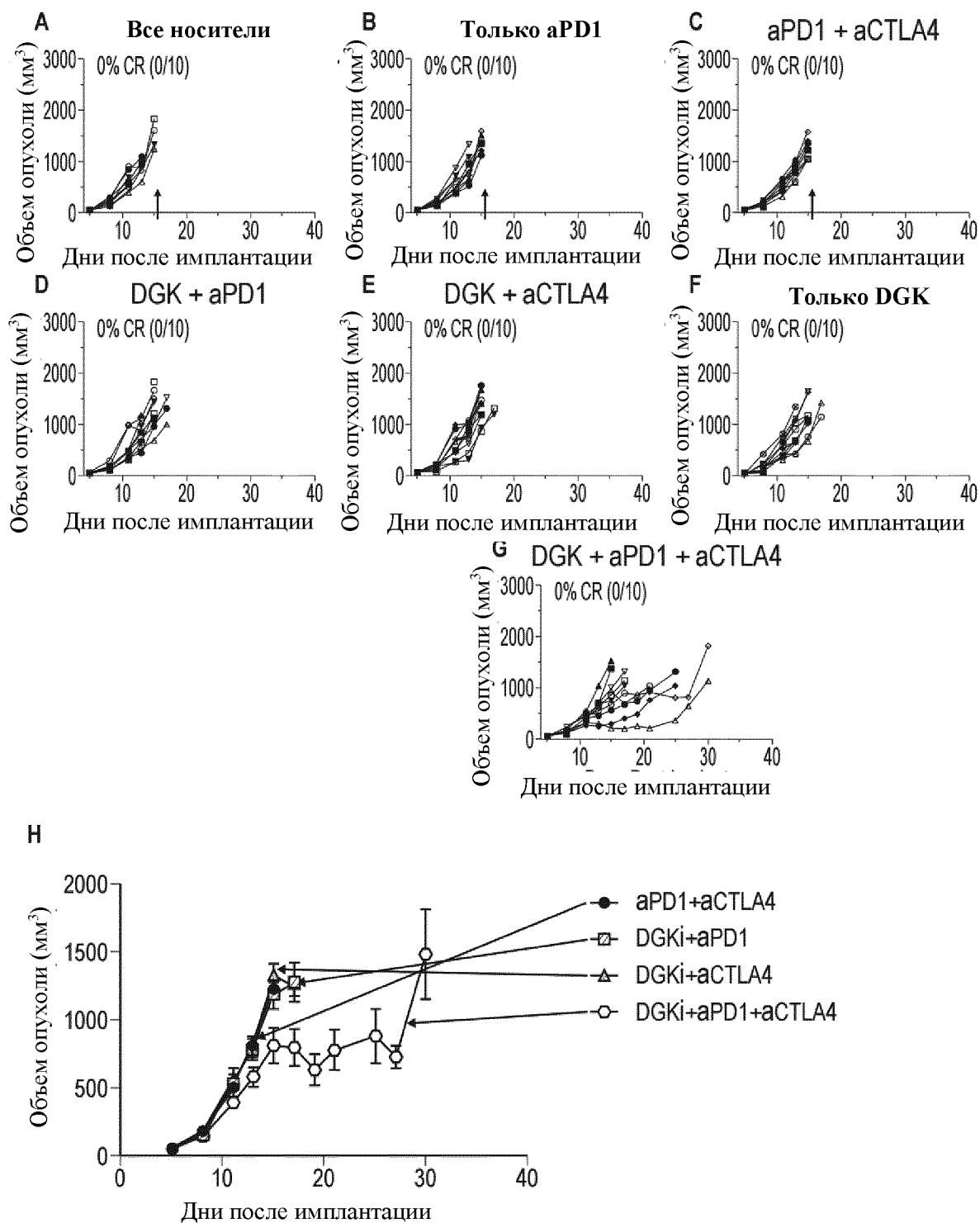
40. Способ по любому из пп. 1-39, включающий введение субъекту антагониста оси PD1/PD-L1 и антагониста CTLA4, где антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой антагонист PD1/PD-L1 или CTLA4, описанный в настоящем документе, или их вариант или производное.

41. Способ по п. 40, где антагонист оси PD1/PD-L1 представляет собой ниволумаб или его вариант, и антагонист CTLA4 представляет собой ипилимумаб или его вариант, например, вариант, обладающий пониженной токсичностью по сравнению с ипилимумабом.

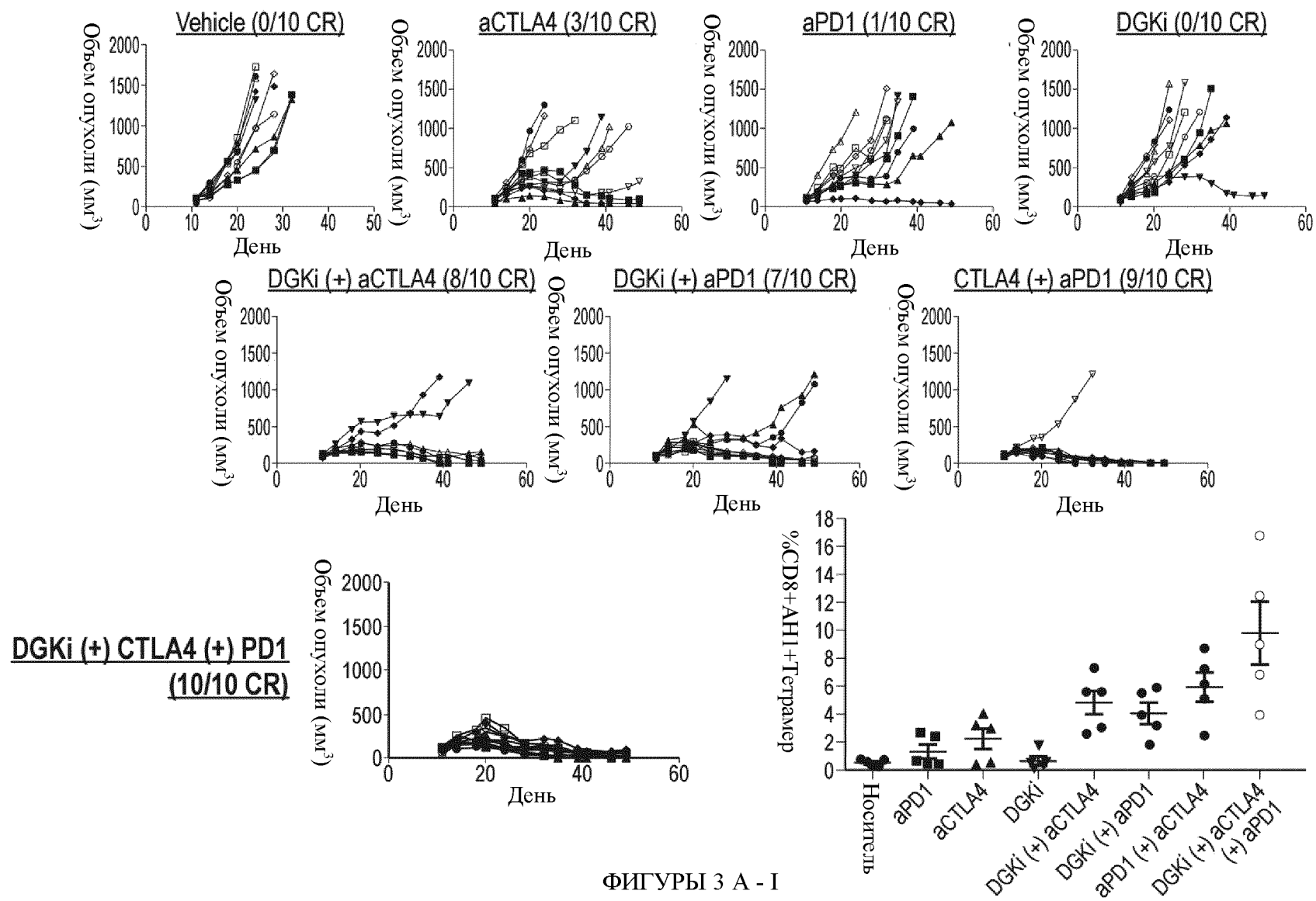
42. Способ по любому из пп. 1-3 и 6-41, где ингибитор DGK α и/или DGK ζ представляет собой ингибитор DGK α и DGK ζ .



ФИГУРЫ 1 А и В

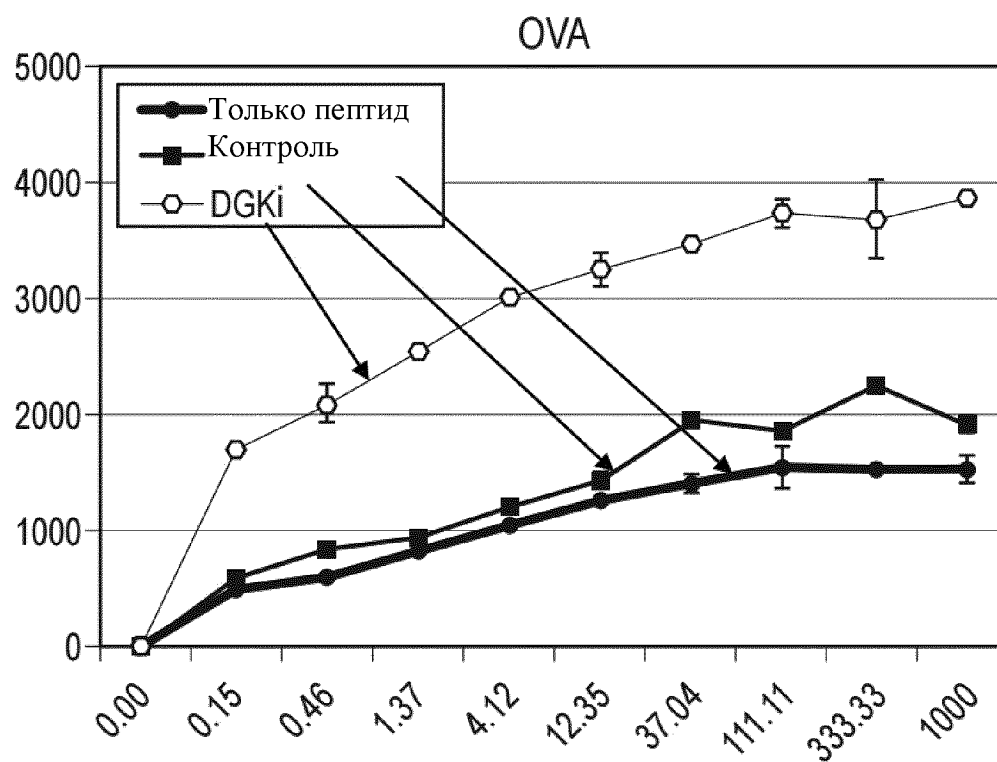


ФИГУРЫ 2 А – Н

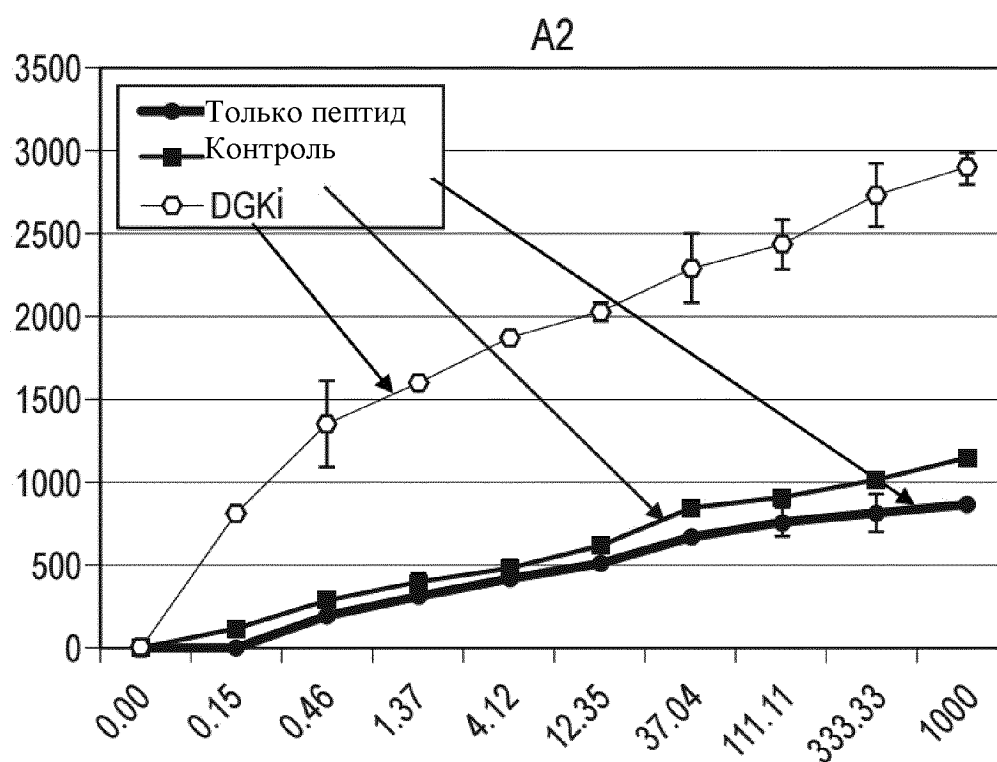


ФИГУРЫ 3 А - I

A

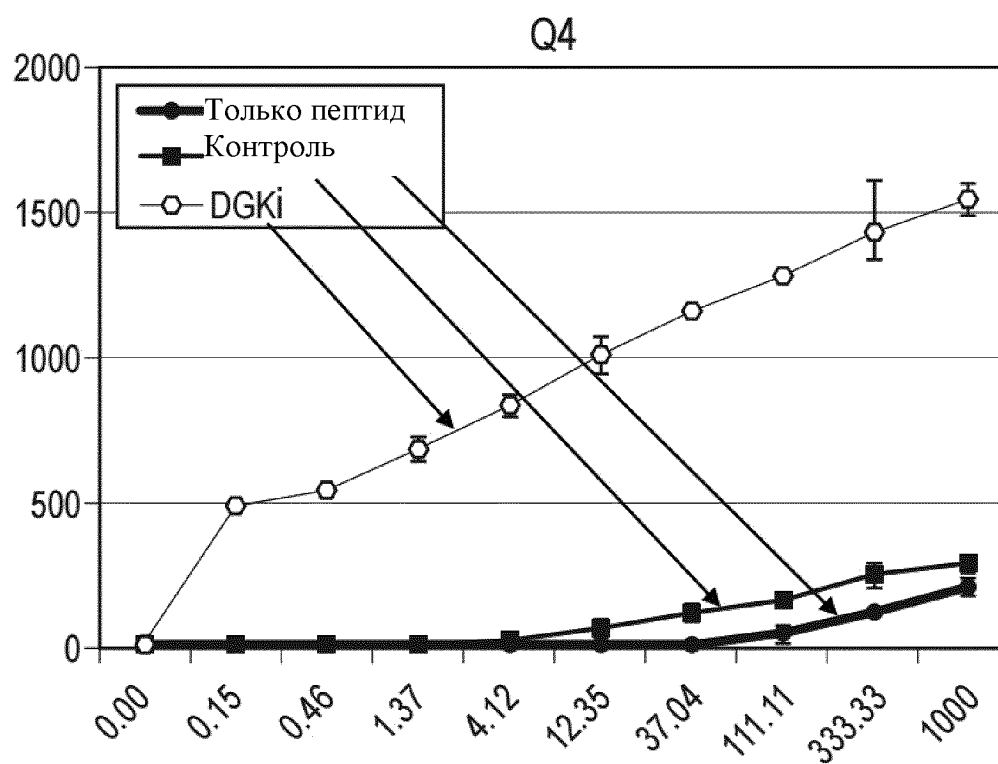


B

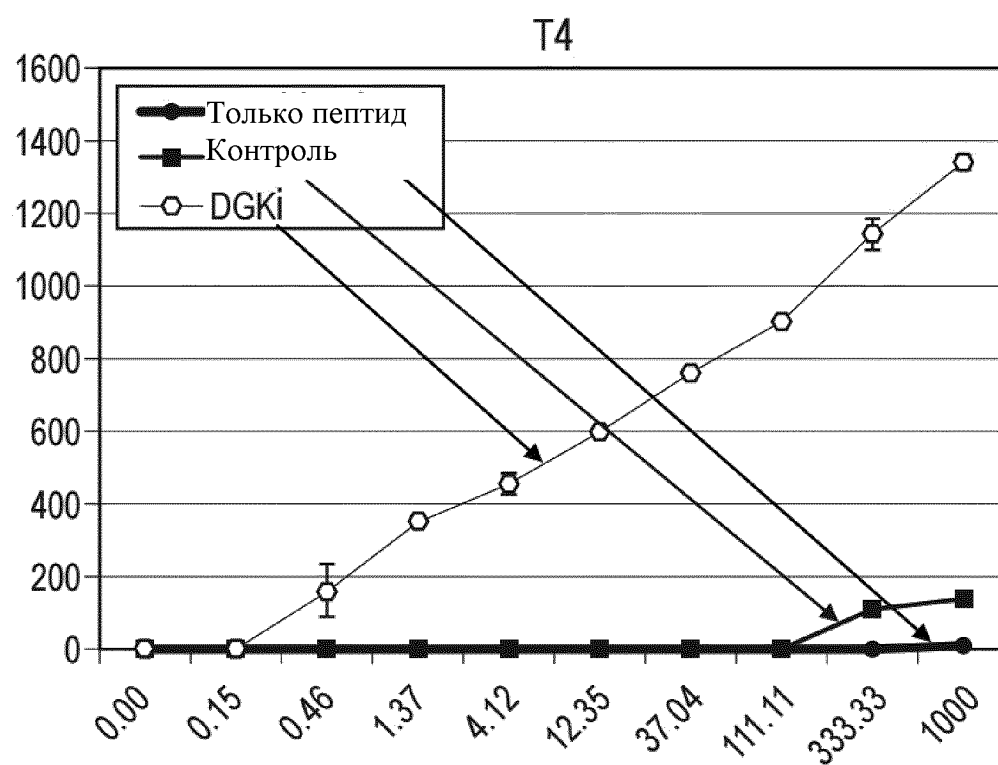


ФИГУРЫ 4 А и В

C

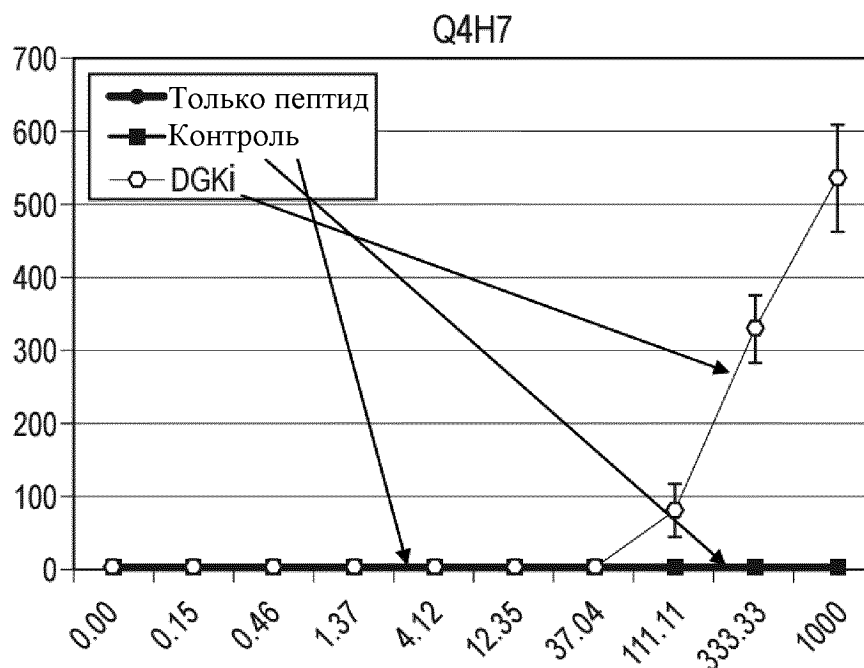


D

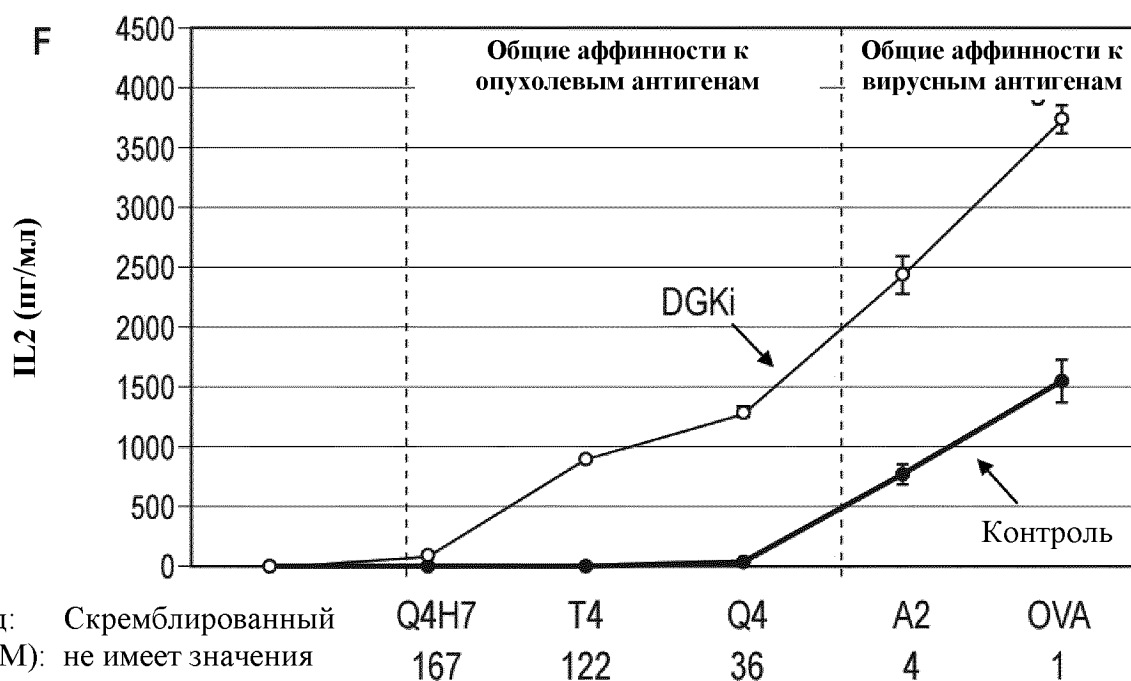


ФИГУРЫ 4 С и D

E



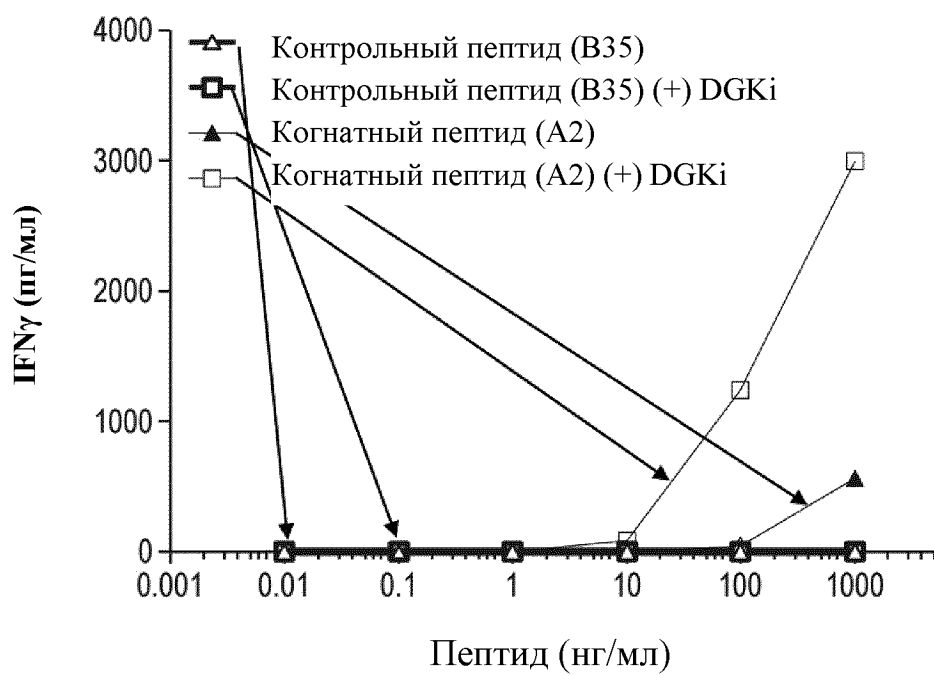
F



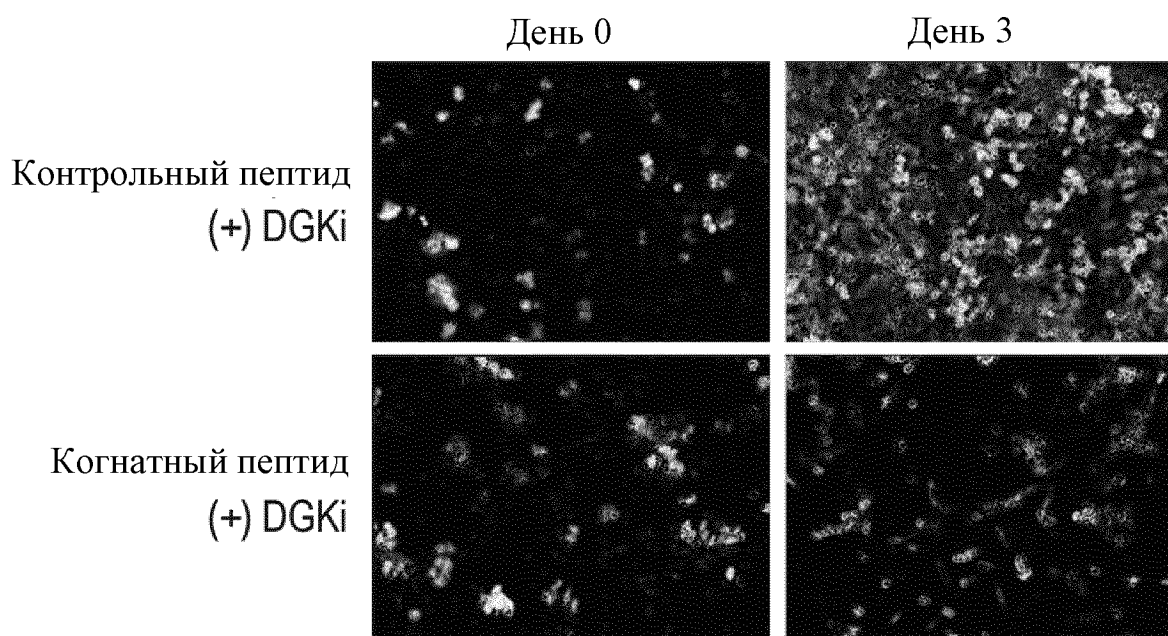
Пептид: Скремблированный
Kd (мкМ): не имеет значения

Аффинность TCR к пептидному антигену

ФИГУРЫ 4 E и F



Увеличенное уничтожение опухолевых клеток



ФИГУРЫ 5 А и В

A HCT116

Нет окрашивания

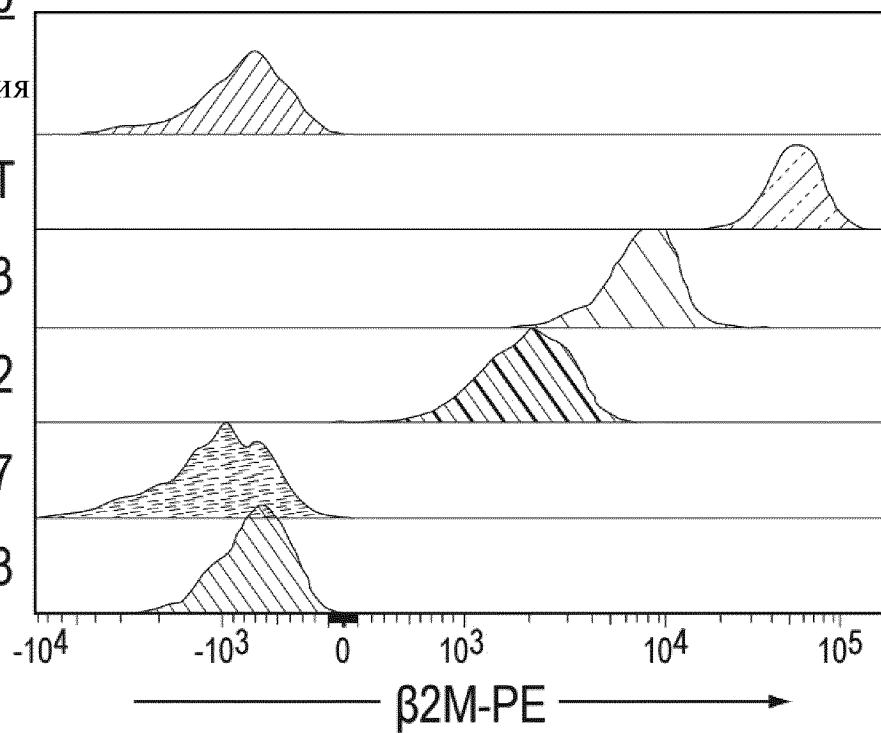
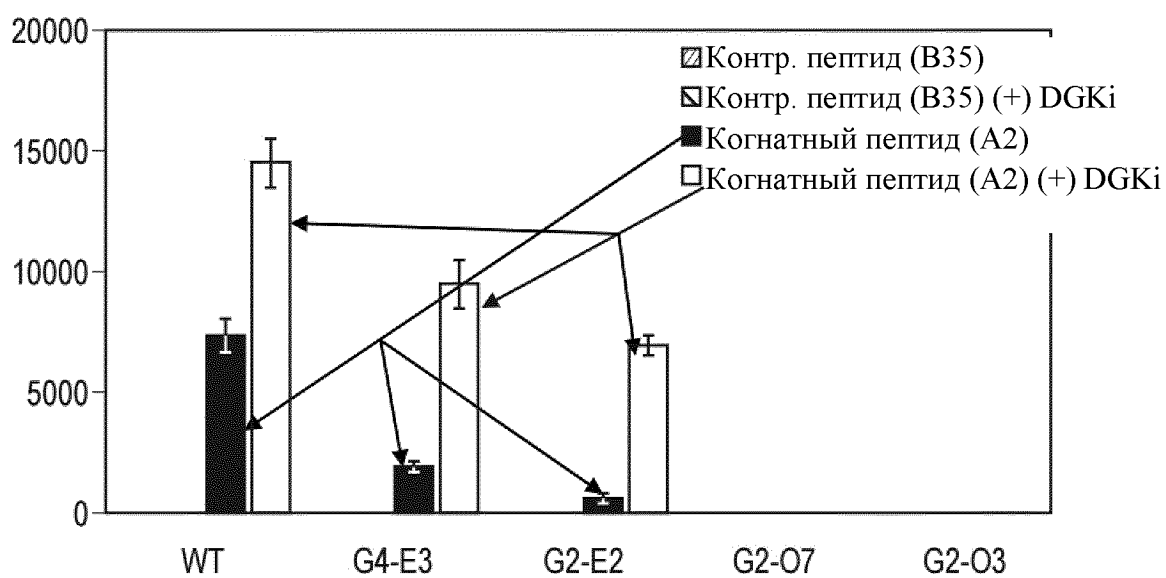
WT

G4-E3

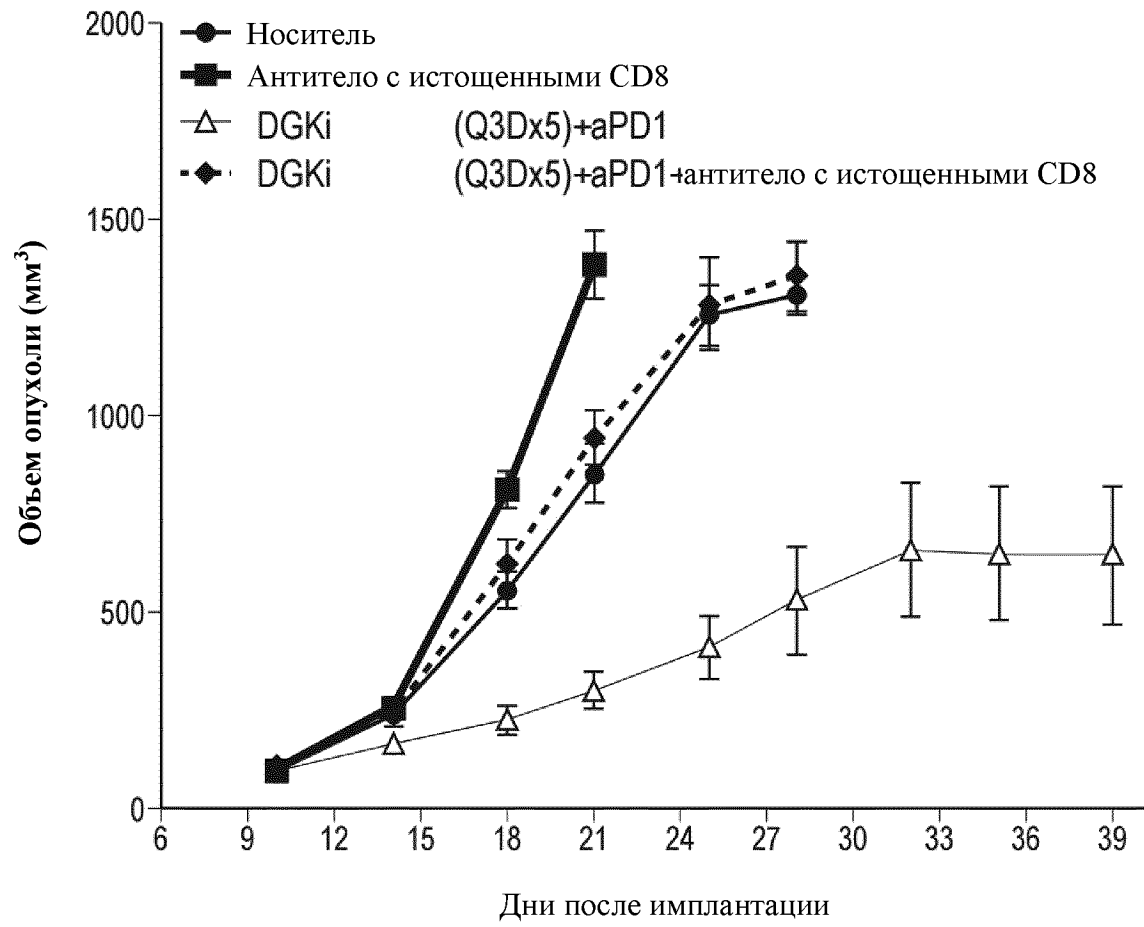
G2-E2

G2-07

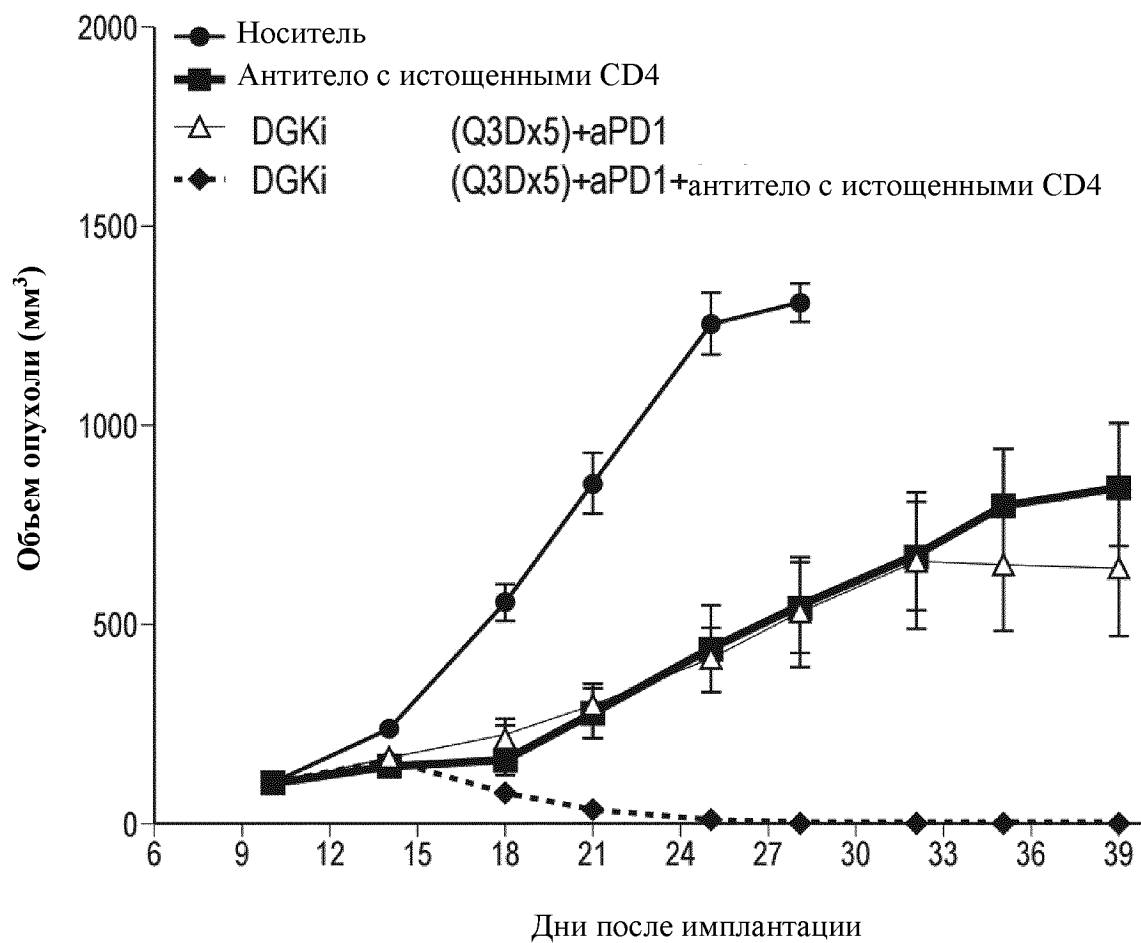
G2-03

**B**

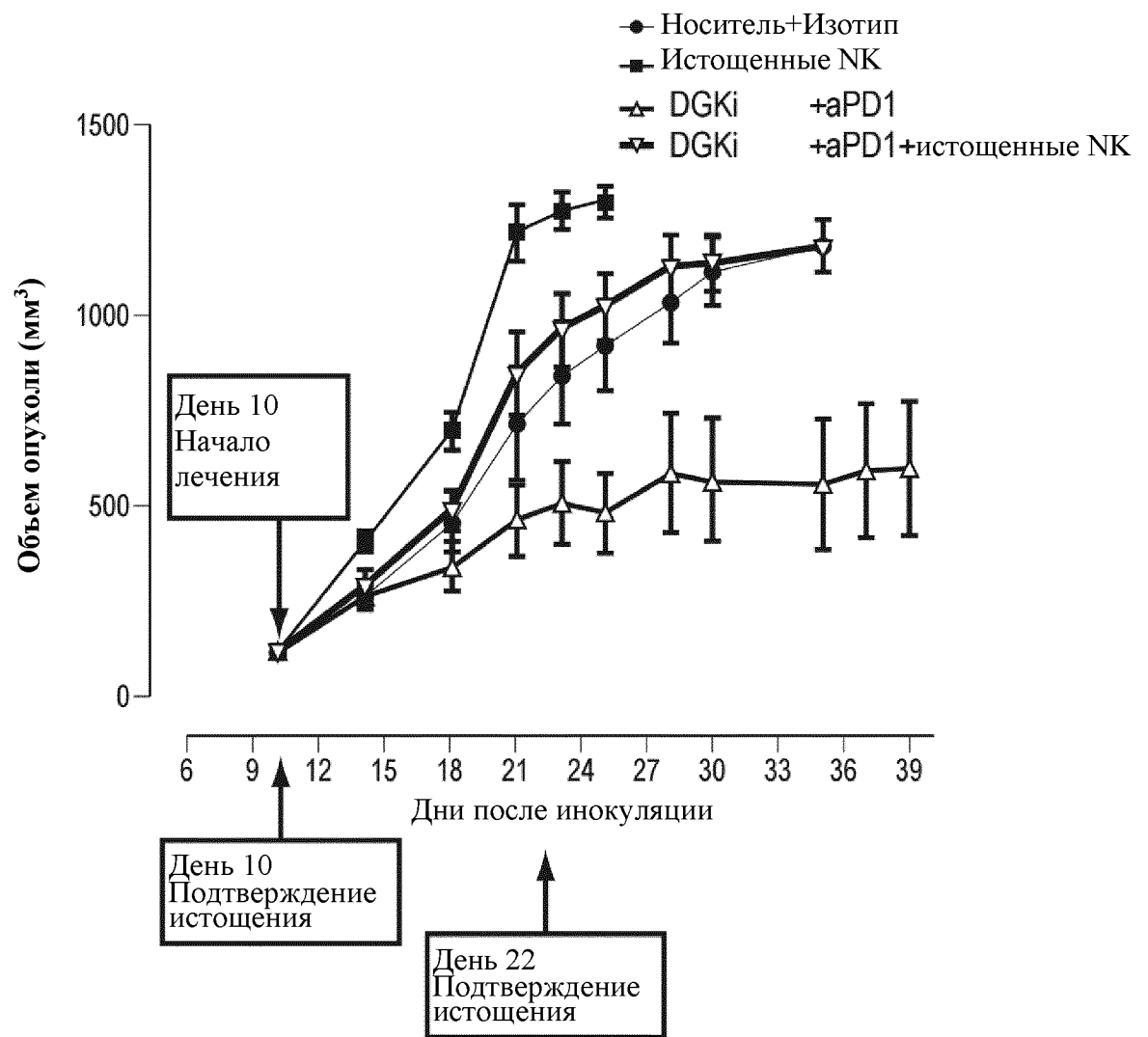
ФИГУРЫ 6 А и В



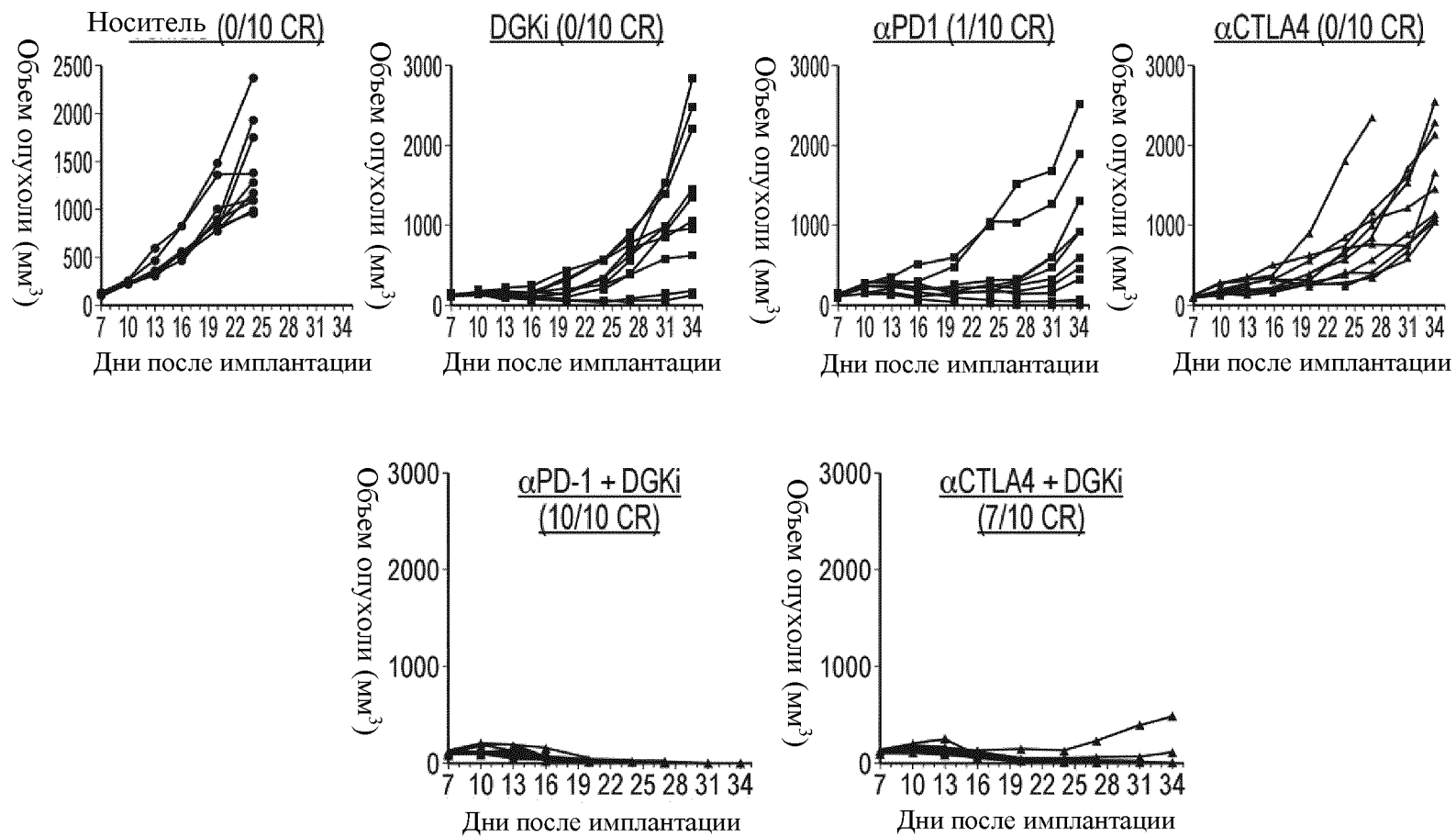
ФИГУРА 7



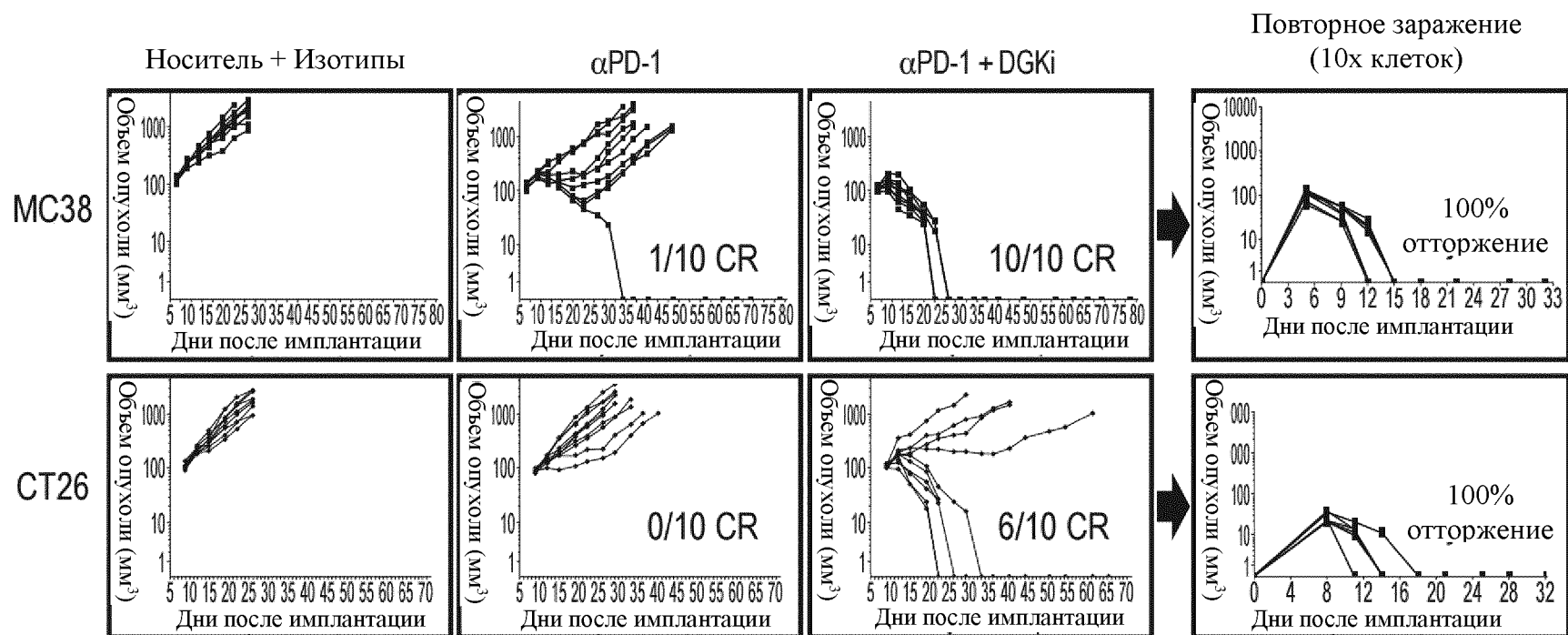
ФИГУРА 8



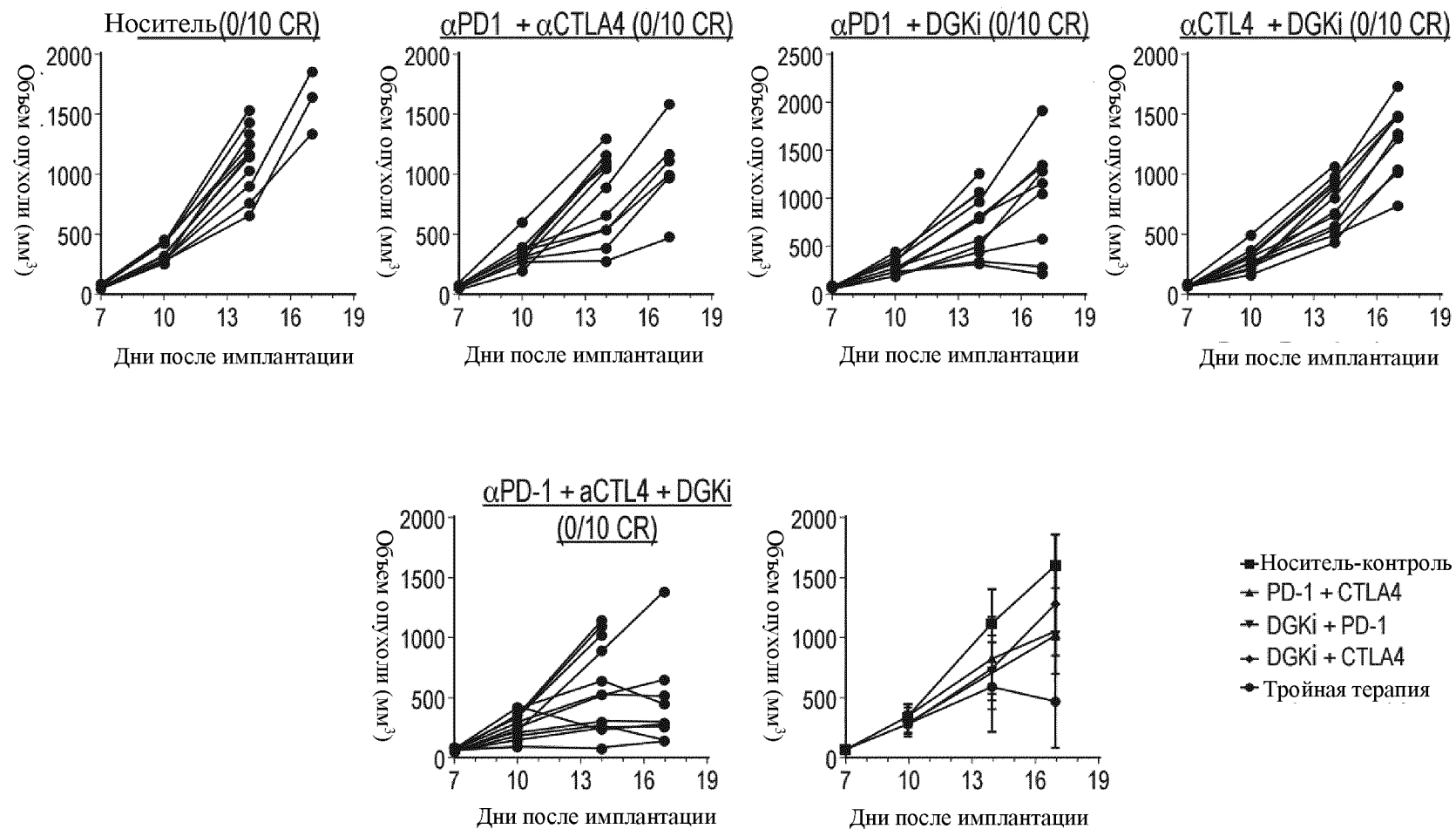
ФИГУРА 9



ФИГУРЫ 10 А - F



ФИГУРЫ 11 А - Н



ФИГУРЫ 12 А - F