(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291966 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.02

(22) Дата подачи заявки
2020.12.22

(51) Int. Cl. ***C07D 401/04*** (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ЗАМЕЩЕННЫЕ ХИНОЛИНОНИЛОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРИМЕНИМЫЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК

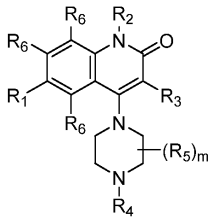
(31) **201911053557**
(32) **2019.12.23**
(33) **IN**
(86) **PCT/US2020/066503**
(87) **WO 2021/133748 2021.07.01**

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

(72) Изобретатель:
Чупак Луис С., Олсон Ричард Е., Велапартхи Апендер, Чжэн Сяофань, Джентлс Роберт Г., Дин Минь (US), Варриер Джайякумар Санкара (IN)

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

(57) Раскрыты соединения формулы (I)



или их соль, где R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 и m определены в настоящем описании. Также раскрыты способы применения таких соединений для ингибирования активности одной или обеих из диацилглицеролкиназы альфа (DGKα) и диацилглицеролкиназы дзета (DGKζ) и фармацевтические композиции, содержащие такие соединения. Данные соединения применимы при лечении вирусных инфекций и пролиферативных нарушений, таких как рак.

202291966 A1

202291966 A1

ЗАМЕЩЕННЫЕ ХИНОЛИНОНИЛОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРИМЕНИМЫЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

Данная заявка испрашивает приоритет индийской предварительной заявки № 201911053557, поданной 23 декабря 2019 года, которая включена в настоящий документ во всей своей полноте.

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к замещенным хинолинониловым соединениям, которые активируют Т-клетки, способствуют пролиферации Т-клеток и/или проявляют противоопухолевую активность. В настоящем изобретении обеспечены замещенные хинолинониловые соединения, композиции, содержащие такие соединения, и способы их применения. Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно соединение по изобретению, которые применимы для лечения пролиферативных нарушений, таких как рак и вирусные инфекции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Раковые опухоли человека содержат многочисленные генетические и эпигенетические изменения, генерирующие неоантигены, потенциально распознаваемые иммунной системой (Sjoblom et al (2006) *Science* 314:268-74). Адаптивная иммунная система, состоящая из Т- и В-лимфоцитов, обладает мощным противораковым потенциалом, с широкими возможностями и исключительной специфичностью ответа на различные опухолевые антигены. Кроме того, иммунная система демонстрирует значительную пластичность и компонент памяти. Успешное использование всех данных качеств адаптивной иммунной системы могло бы сделать иммунотерапию уникальной среди всех способов лечения рака. Однако, хотя эндогенный иммунный ответ на рак наблюдается в доклинических моделях и у пациентов, данный ответ неэффективен, и сформировавшиеся злокачественные опухоли рассматриваются как "собственные" и толерируются иммунной системой. Поддерживая такое состояние толерантности, опухоли могут использовать

несколько различных механизмов для активного подрыва противоопухолевого иммунитета. Данные механизмы включают дисфункциональную Т-клеточную сигнализацию (Mizoguchi et al., (1992) *Science* 258:1795-98), супрессивные регуляторные клетки (Facciabene et al., (2012) *Cancer Res.* 72:2162-71) и кооптирование эндогенных "иммунных контрольных точек", которые служат для снижения интенсивности адаптивных иммунных ответов и защиты нормальных тканей от сопутствующего повреждения, опухолями для уклонения от иммунного уничтожения (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 преобразование диацилглицерола в фосфатидную кислоту, тем самым подавляя функции Т-клеток, передающиеся через сигнальный путь TCR. Таким образом, DGK служат внутриклеточными контрольными точками, и ожидается, что ингибирование DGK может усиливать сигнальные пути Т-клеток и активацию Т-клеток. Подтверждением тому служат мышиные модели с нокаутом DGKα или DGKζ , которые демонстрируют гиперреактивный фенотип Т-клеток и улучшенную противоопухолевую иммунную активность (Riese M.J. et al., *Journal of Biological Chemпредставляет собойtry,* (2011) 7: 5254- 5265; Zha Y et al., *Nature Immunology,* (2006) 12:1343; Olenchock B.A. et al., (2006) 11:1174-81). Кроме того, было обнаружено, что инфильтрирующие опухоль лимфоциты, выделенные от пациентов с почечно-клеточной карциномой человека, сверхэкспрессируют DGKα , что приводит к ингибированию функции Т-клеток (Prinz, P.U. et al., *J Immunology* (2012) 12:5990-6000). Таким образом, DGKα и DGKζ рассматриваются как мишени 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 и 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.

Сохраняется потребность в соединениях, применимых в качестве ингибиторов одной или обеих из DGKα и DGKζ. Кроме того, сохраняется потребность в соединениях, применимых в качестве ингибиторов одной из обеих из DGKα и DGKζ, которые обладают селективностью по сравнению с другими

диацилглицеролкиназами, протеинкиназами и/или другими липидкиназами.

Соответственно, средство, которое является безопасным и эффективным в восстановлении активации Т-клеток, способствующее снижению антигенного порога, усилению противоопухолевого действия и/или преодолению супрессивных эффектов одной или нескольких эндогенных иммунных контрольных точек, таких как PD-1, LAG-3 и TGFβ, было бы важным дополнением для лечения пациентов с пролиферативными нарушениями, такими как рак, а также вирусными инфекциями.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявители обнаружили соединения, которые обладают активностью ингибиторов одной или обеих из DGKα и DGKζ. Кроме того, заявители обнаружили соединения, которые обладают активностью ингибиторов одной или обеих из DGKα и DGKζ и обладают селективностью относительно других диацилглицеролкиназ, протеинкиназ и/или других липидкиназ. Данные соединения предназначены для применения в качестве фармацевтических препаратов с желаемой стабильностью, биодоступностью, терапевтическим индексом и значениями токсичности, которые важны для их лекарственной пригодности.

Настоящее изобретение обеспечивает замещенные хинолинониловые соединения формулы (I), которые можно применять в качестве ингибиторов DGKα, DGKζ или как DGKα, так и DGKζ, включая их соли и пролекарства.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания или расстройства, связанного с активностью DGKα, DGKζ или как DGKα, так и DGKζ, включающему введение пациенту-млекопитающему соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к способам и промежуточным соединениям для получения соединений формулы (I) и/или их солей.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии.

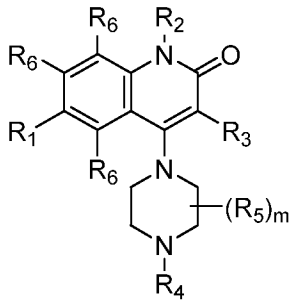
Настоящее изобретение также относится к применению соединений формулы (I) и/или их фармацевтически приемлемых солей для изготовления лекарственного средства для лечения пролиферативных нарушений, таких как рак, и вирусных инфекций.

Соединения формулы (I) и композиции, содержащие соединения формулы (I), можно применять для лечения, предотвращения или вылечивания вирусных инфекций и различных пролиферативных нарушений, таких как рак. Фармацевтические композиции, содержащие данные соединения, применимы для лечения, предотвращения или замедления прогрессирования различных терапируемых заболеваний или нарушений, таких как вирусные инфекции и рак

Данные и другие признаки изобретения будут изложены в развернутом виде по мере дальнейшего раскрытия.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Первый аспект настоящего изобретения обеспечивает по меньшей мере одно соединение формулы (I):



(I)

или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, C_{1-3}алкокси, замещенный от нуля до 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, $–OCH_3$ 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 от нуля до 4 R_{1a};

R_2 представляет собой H, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{2a}, C_{2-3} алкенил,

замещенный от нуля до 4 R_{2a}, или C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 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;

R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1-3} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} фторциклоалкил , $–NO_2$ или пиридинил, замещенный от нуля до 2 R_{3a};

каждый R_{3a} представляет собой галоген, –CN, C_{1-3} алкил или C_{1-3} алкокси;

R_4 представляет собой $–CH_2R_{4a}$, $–CH_2CH_2R_{4a}$, $–CH_2CHR_{4a}R_{4d}$, $–CHR_{4a}R_{4b}$ или $–CR_{4a}R_{4b}R_{4c}$;

R_{4a} и R_{4b} независимо друг от друга представляют собой:

(i) C_{1-6} алкил, замещенный от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –CN, –OH, $–OCH_3$, $–SCH_3$, 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 из которых замещен от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-4} -гидроксиалкила, $–O(CH)_{1-3}O(C_{1-3}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $–O(C_{1-4}$ гидроксиалкила), $–O(CH)_{1-3}O(C_{1-3}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $–O(CH)_{1-3}NR_cR_c$, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C\equiv CH$, $–C(O)(C_{1-4}$ 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), $–P(O)(C_{1-3}$ алкила)$_2$, $–S(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $–O(CH_2)_{1-2}(C_{3-6}$ циклоалкила), $–O(CH_2)_{1-2}$(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, причем указанная циклическая группа замещена от нуля до 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, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C\equiv CH$, $–NR_cR_c$, $–NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $–NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $–NR_aC(O)O(C_{1-4}$ 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 от нуля до 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, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C≡CH$, $–NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, причем каждая циклическая группа замещена от нуля до 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 от нуля до 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 Rc независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный от нуля до 1 заместителем, выбранным из F, Cl, –CN, $–CH_3$ и $–OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, C_{1-6} -алкил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{1-3} алкокси, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-4} алкенил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-4}алкинил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_g, фенил, замещенный от нуля до 4 R_g, оксадиазолил, замещенный от нуля до 3 R_g, пиридинил, замещенный от нуля до 4 R_g, $–(CH_2)_{1-2}$(гетероциклил, замещенный от нуля до 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), или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O;

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), C_{3-5} циклоалкил или $–NR_cR_c$;

каждый R_6 представляет собой H, F, Cl, –CN, $–CH_3$, $–CH_2F$, $–CHF_2$, $–CF_3$ или $–OCH_3$;

m равно нулю, 1, 2 или 3; и

n равно нулю, 1 или 2.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где: R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, циклопропил, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, C_{1-3}-алкокси, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, $-C(O)NR_aR_a$, $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ 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, C_{1-2} алкил, замещенный от нуля до 2 R_{2a}, или C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 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, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил, $-NO_2$ или пиридинил, замещенный от нуля до 2 R_{3a}; R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой: (i) C_{1-4} алкил, замещенный от нуля до 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 от нуля до 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} гидроксиалкила), $-O(CH)_{1-2}O(C_{1-2}$ 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, 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, причем указанная циклическая группа замещена от нуля до 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), -NRaC(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 от нуля до 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, причем каждая циклическая группа замещена от нуля до 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 от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –OH, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и –CN; каждый R_5 независимо представляет собой F, –CN, –OH, C_{1-5} алкил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{1-2} алкокси, замещенный от нуля до 3 R_g, C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-3} алкинил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_g, фенил, замещенный от нуля до 3 R_g, оксадиазолил, замещенный от нуля до 3 R_g, пиридинил, замещенный от нуля до 3 R_g, $-(CH_2)_{1-2}$(гетероциклил, замещенный от нуля до 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), или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O; каждый R_6 представляет собой H, F или $-CH_3$; и m равно нулю, 1, 2 или 3.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где: R_1 представляет собой H, F, –CN или $-OCH_3$; R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2CH_2F$ или $-CH_2CH=CH_2$; R_3 представляет собой H, –CN, $-CH_2OH$, $-C(O)OCH_2CH_3$, $-NO_2$ или пиридинил; R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CHR_{4a}R_{4b}$; R_{4a} представляет собой фенил, нафталинил или индолил, каждый из которых замещен от нуля до 2 заместителями, независимо выбранными из F, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ и $-OCH_3$; R_{4b} представляет собой фенил или фторфенил; каждый R_5 представляет собой $-CH_3$, или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O; и m равно нулю, 1 или 2.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I)

или его соль, где R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, циклопропил, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, C_{1-3}алкокси, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, $-C(O)NR_aR_a$, $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ или $-P(O)(CH_3)_2$. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, $-CH_3$, $-CHF_2$, $-CF_3$, циклопропил или $-OCH_3$. Также в данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, F, –CN или $-OCH_3$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_2 представляет собой H, C_{1-2} алкил, замещенный от нуля до 2 R_{2a}, или C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 2 R_{2a}. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2CH_2F$ или $-CH_2CH{=}CH_2$. Также в данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$ или $-CH_2CH_2F$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1-2} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил, $-NO_2$ или пиридинил, замещенный от нуля до 2 R_{3a}. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_3 представляет собой H, –CN, $-CH_2OH$, $-C(O)OCH_2CH_3$, $-NO_2$ или пиридинил. В данный вариант осуществления также включены соединения, в которых R_3 представляет собой H, –CN, $-CH_2OH$ или $-NO_2$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CH_2CH_2R_{4a}$. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CD_2R_{4a}$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_4 представляет собой $-CD_2R_{4a}$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$ или $-CR_{4a}R_{4b}R_{4c}$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I)

или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CHR_{4a}R_{4b}$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 1, 2 или 3; и каждый R_5 независимо представляет собой F, –CN, –OH, C_{1-5} алкил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{1-2} алкокси, замещенный от нуля до 3 R_g, C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-3} алкинил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_g, фенил, замещенный от нуля до 3 R_g, оксадиазолил, замещенный от нуля до 3 R_g, пиридинил, замещенный от нуля до 3 R_g, $-(CH_2)_{1-2}$(гетероциклил, замещенный от нуля до 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), или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых каждый R_5 независимо представляет собой F, –CN, –OH, C_{1-2} алкил, замещенный от нуля до 3 R_g, C_{1-2} алкокси, замещенный от нуля до 3 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 2 R_g, $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), –C(O)OH, $-C(O)O(C_{1-2}$ алкил), или $-C(O)NR_aR_a$, или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O. Также в данный вариант осуществления включены соединения, в которых каждый R_5 представляет собой $-CH_3$, или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 2 и два R_5 присоединены к одному и тому же атому углерода с образованием =O.

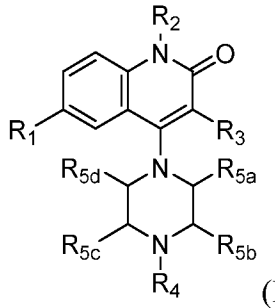
В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно нулю.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 1, 2 или 3. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых m равно 1 или 2. В данный вариант осуществления также включены соединения, в которых m равно 1.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 2 или 3. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых m равно 2.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 3.

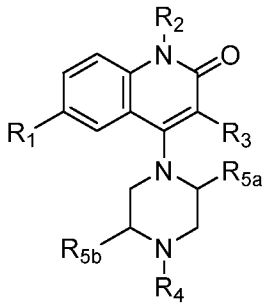
В одном варианте осуществления обеспечивается соединение Формулы (I) или его соль, имеющее структуру Формулы (II):



(II)

где каждый из одного, двух или трех из R_{5a}, R_{5b}, R_{5c} и R_{5d} представляет собой R_5, и каждый из остальных R_{5a}, R_{5b}, R_{5c} и R_{5d} представляет собой водород. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых каждый R_5 независимо представляет собой –CN, $–CH_3$, $–CH_2CH_3$, $–CH(CH_3)_2$, $–CHC(CH_3)_2$, $–CH_2F$, $–C(CH_3)_2F$, $–CF(CH_3)CH(CH_3)_2$, $–CH_2OH$, $–C(CH_3)_2OH$, $–C(CH_3)(OH)CH(CH_3)_2$, $–CH_2OCH_3$, $–C(O)C(CH_3)_2$, –C(O)OH, $–C(O)OCH_3$, $–C(O)OC(CH_3)_2$, $–C(O)NH_2$, –C(O)NH(циклопропил), –C(O)O(циклопропил), циклопропил, фенил, метилоксадиазолил или метилпиридинил.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение Формулы (I) или его соль, имеющее структуру Формулы (III):



(III).

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $–CH_3$ и R_{5c} представляет собой $–CH_3$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III)

или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_3$ и R_{5c} представляет собой $-CH_2CH_3$.

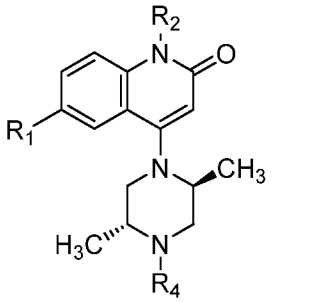
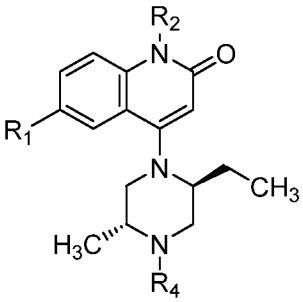
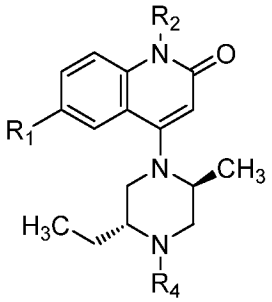
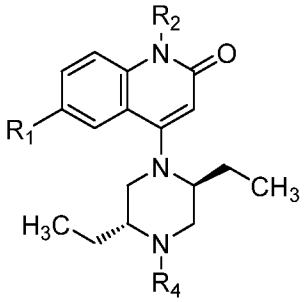
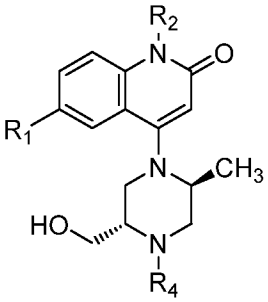
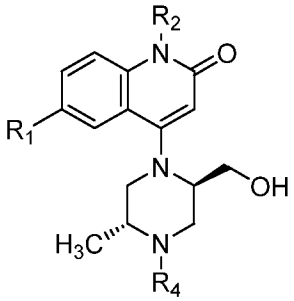
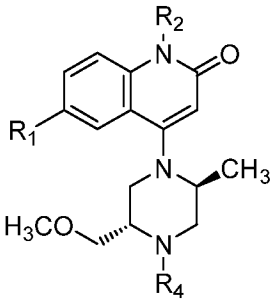
В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_2CH_3$ и R_{5c} представляет собой $-CH_3$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_2CH_3$ и R_{5c} представляет собой $-CH_2CH_3$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_3$ и R_{5c} представляет собой $-CH_2OH$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_3$ и R_{5c} представляет собой $-CH_2OCH_3$.

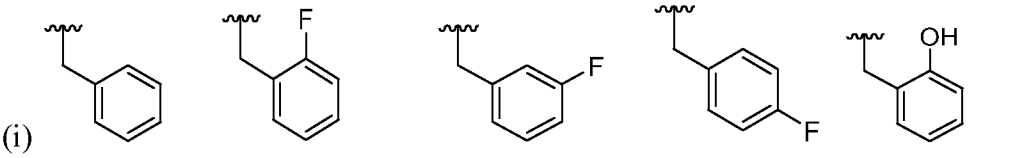
В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или соединение формулы (III) или его соль, имеющее структуру:

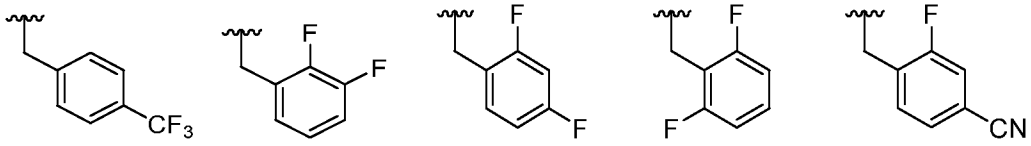








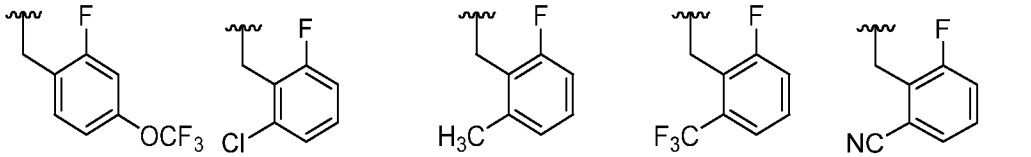
или .

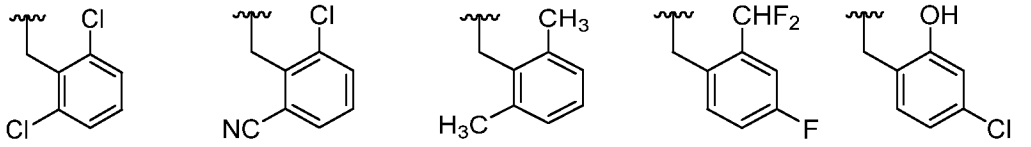
В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой:

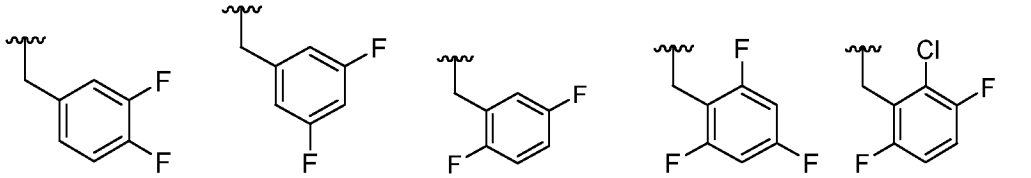
(i)

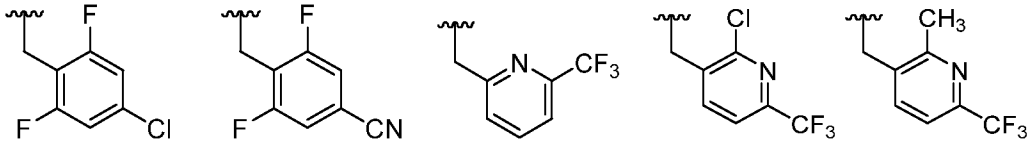


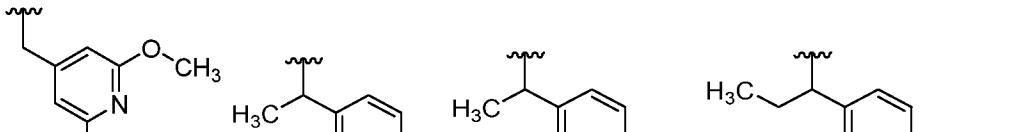




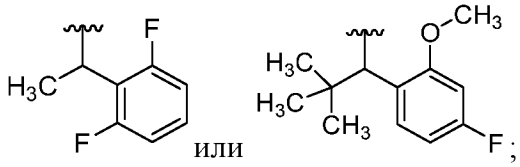






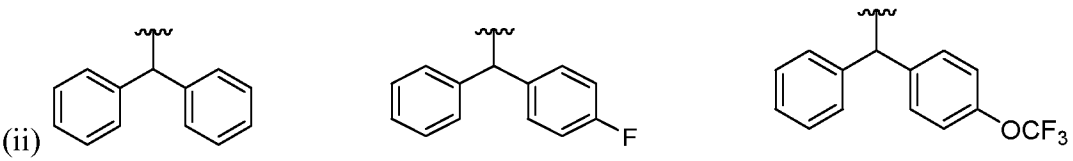


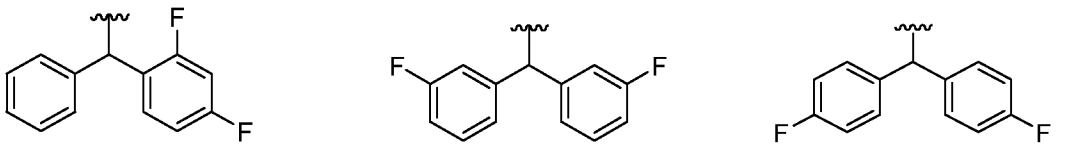
или

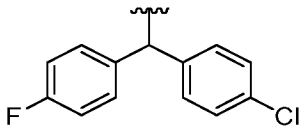
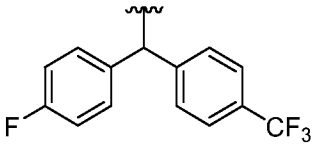
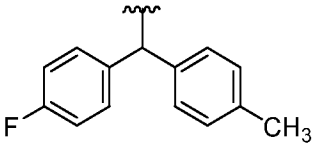
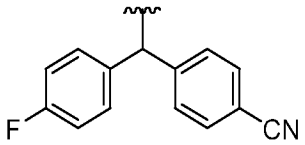
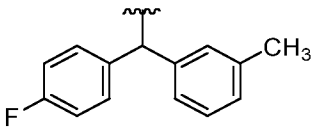
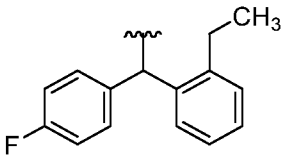
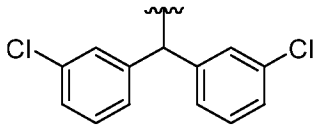
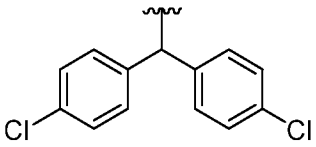
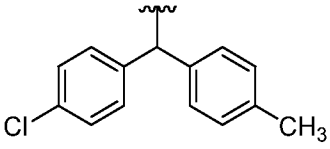
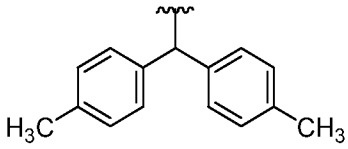
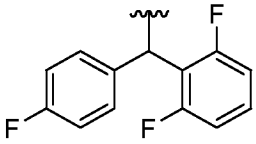
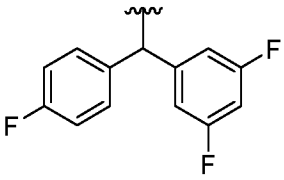
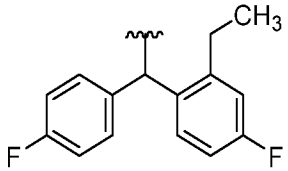
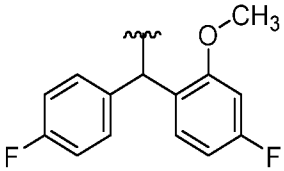
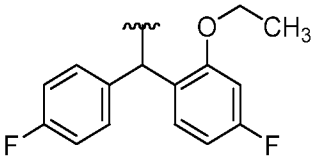
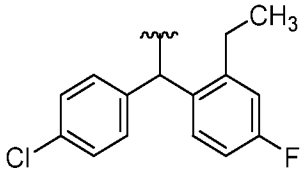
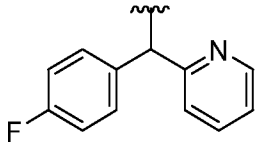
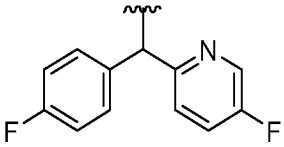
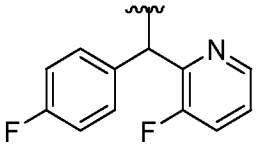
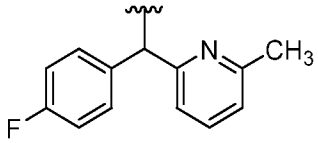
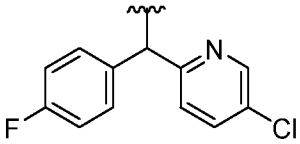
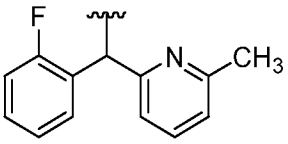
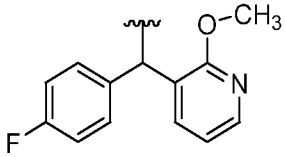
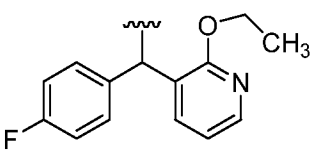
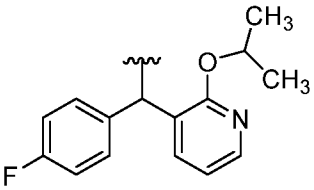


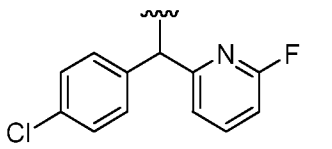
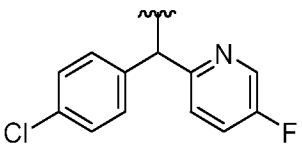
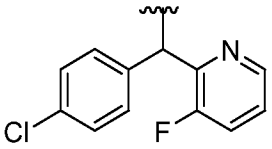
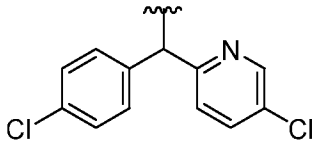
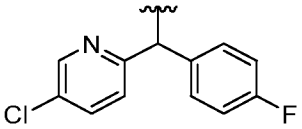
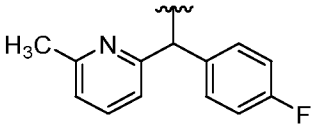
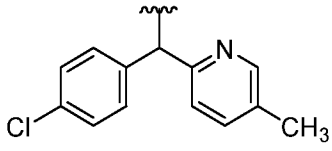
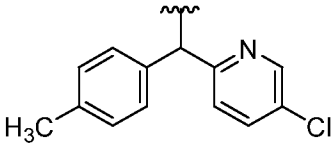
;

(ii)

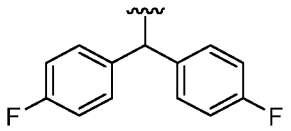
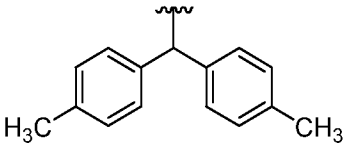
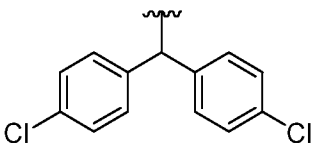
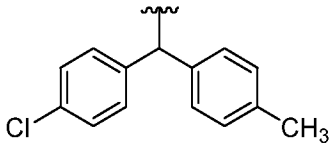
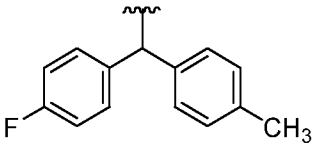
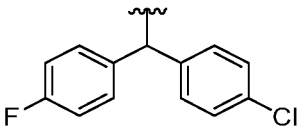
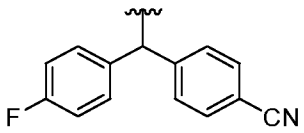
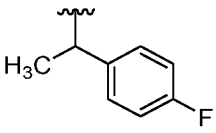
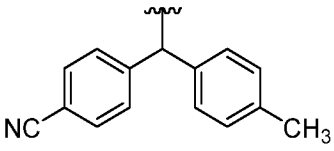
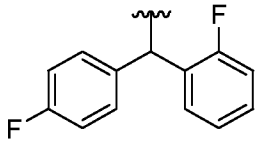
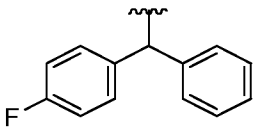
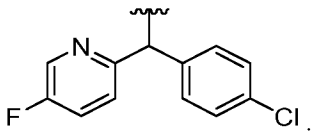



















или

; или
(iii)

















или

. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, Br, –CN или $–OCH_3$; и R_2 представляет собой $–CH_3$.

В одном варианте осуществления обеспечивается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой:












или

. В данный вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, Br, –CN или $–OCH_3$; и R_2 представляет собой $–CH_3$. В данный вариант осуществления также включены соединения, в которых R_1 представляет собой –CN; и R_2 представляет собой $–CH_3$.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I) или его соль обеспечивается в виде указанного соединения:

6-фтор-4-{4-[(3-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-нитро-1,2-

дигидрохинолин-2-он (1);

6-фтор-4-{4-[(3-фтор-5-метилфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-2-он (2);

4-(4-((1H-индол-4-ил)метил)пиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он (3);

4-{4-[(1-этил-1H-индол-4-ил)метил]пиперазин-1-ил}-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (4);

4-(4-бензил-3-оксопиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (5);

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил (6);

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-карбонитрил (7);

6-метокси-1-метил-4-{4-[(нафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (8);

4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метилхинолин-2(1H)-он (9);

4-[4-(дифенилметил)пиперазин-1-ил]-3-(гидроксиметил)-1-метил-1,2-дигидрохинолин-2-он (11);

этил 4-{4-[(2-метоксинафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат (12);

4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-3-нитрохинолин-2(1H)-он (13);

4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-(2-фторэтил)-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (14);

2-(4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-1-ил)ацетонитрил (15); или

4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-1-(проп-2-ен-1-ил)-1,2-дигидрохинолин-2-он (16).

Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не выходя за его сущность или существенные признаки. Настоящее изобретение охватывает все комбинации отмеченных аспектов и/или изобретения. Понятно, что любой и все элементы настоящего изобретения могут рассматриваться в сочетании с любым другим вариантом осуществления или предлагаться для описания

дополнительных вариантов осуществления. Также следует понимать, что каждый отдельный элемент значения предназначен для объединения с любыми и всеми другими элементами из любого варианта осуществления для описания дополнительного варианта осуществления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Признаки и преимущества изобретения могут быть более понятны специалистам в данной области техники после прочтения следующего подробного описания. Следует понимать, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны выше и ниже в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть объединены для формирования одного варианта осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть объединены, чтобы образовать их подкомбинации. Варианты осуществления, обозначенные здесь как иллюстративные или предпочтительные, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения.

Если в настоящем документе специально не указано иное, ссылки, сделанные в единственном числе, могут также включать множественное число. Например, формы единственного числа могут относиться либо к одному, либо к одному или нескольким.

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

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

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

Ниже перечислены определения различных терминов, используемых для описания настоящего изобретения. Данные определения применяются к терминам в том виде, в каком они используются в описании (если они не ограничены иным образом в конкретных случаях) либо по отдельности, либо как часть более крупной группы.

На протяжении описания группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области техники для получения стабильных фрагментов и соединений.

В соответствии с соглашением, используемым в данной области техники,

используется в структурных формулах в настоящем документе для обозначения связи, которая является точкой присоединения фрагмента или заместителя к структуре ядра или основной цепи.

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

Термин «циано» относится к группе -CN.

Термин «амино» относится к группе $-NH_2$.

Термин «азидо» относится к группе $-N_3$.

Термин «оксо» относится к группе =O.

Используемый в настоящем документе термин «алкил» относится как к разветвленным, так и к линейным насыщенным алифатическим углеводородным группам, 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 не ограничиваются ими, 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, «C_{1-4} 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 как разветвленных, так и линейных насыщенных алифатических углеводородных групп, замещенных одним или несколькими атомами фтора. Например, подразумевается, что «C_{1-4} фторалкил» включает C_1, C_2, C_3 и C_4 алкильные группы, замещенные одним или несколькими атомами фтора. Репрезентативные примеры фторалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, $-CF_3$ и $-CH_2CF_3$.

Термин «гидроксиалкил» включает как разветвленные, так и линейные насыщенные алкильные группы, замещенные одной или несколькими гидроксильными группами. Например, «гидроксиалкил» включает $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$ 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 тройную связь углерод-углерод. 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 молекулы неароматического моноциклического углеводорода путем удаления одного атома водорода от насыщенного атома углерода в кольце. Репрезентативные примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклопентил и циклогексил. Когда числа появляются в нижнем индексе после символа «С», нижний индекс более точно определяет количество атомов углерода, которое может содержать конкретная циклоалкильная группа. Например, «C_{3-6} циклоалкил» обозначает циклоалкильные группы с от трех до шести атомами углерода.

Термин «фторциклоалкил», используемый в настоящем документе, включает циклоалкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами фтора.

Термин «алкокси», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, присоединенной к основному молекулярному фрагменту через атом кислорода, например, к метоксигруппе (-OCH_3). Например, «C_{1-3} алкокси» обозначает алкоксигруппы с от одного до трех атомами углерода.

Термины «фторалкокси» и «-О(фторалкил)» представляют собой фторалкильную группу, как определено выше, присоединенную через кислородную связь (О). Например, «C_{1-4} фторалкокси» включает C_1, C_2, C_3 и C_4 фторалкоксигруппы.

Термины «карбоцикло», «карбоциклический» или «карбоциклил» могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к циклическим группам, имеющим по меньшей мере одно насыщенное или частично насыщенное неароматическое кольцо, где все атомы всех колец представляют собой углерод. Карбоциклильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности. Таким образом, термин включает неароматические кольца, такие как, например, циклоалкильные, циклоалкенильные и циклоалкинильные кольца. Примеры бициклических карбоциклильных групп включают инданил, инденил, дигидронафталинил, тетрагидронафтенил, гексагидронафталинил, октагидронафталинил, декагидронафталинил, бициклогептанил, бициклооктанил и бициклононанил.

Используемый в настоящем документе термин «арил» относится к группе атомов, полученных из молекулы, содержащей ароматическое углеродное кольцо (кольца), путем удаления одного атома водорода, который связан с ароматическим кольцом (кольцами). Репрезентативные примеры арильных групп включают, но не ограничиваются ими, фенил и нафтил. Арильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Термин «бензил», используемый в настоящем документе, относится к метильной группе, в которой один из атомов водорода заменен фенильной группой. Фенильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Термин «гетероатом» относится к кислороду (О), сере (S) и азоту (N).

Термины «гетероцикло», «гетероциклил» или «гетероциклил» могут

использоваться взаимозаменяемо и относиться к циклическим группам, имеющим насыщенное или частично насыщенное неароматическое кольцо (кольца) и где одно или несколько колец содержат по меньшей мере один гетероатом (O, S или N), при этом указанное кольцо, содержащее гетероатом, предпочтительно имеет от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, S и/или N. Кольцо такой группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или из от одного до четырех атомов азота при условии, что общее число гетероатомов в каждом кольце равно четырем или менее, и дополнительно при условии, что кольцо содержит по меньшей мере один атом углерода. Атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и атомы азота могут быть необязательно кватернизованы. Гетероциклогруппа может быть присоединена к любому доступному атому азота или углерода. Гетероциклокольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Примеры моноциклических гетероциклических групп включают пирролидинил, имидазолинил, оксазолидинил, изоксазолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, пиперазинил, 2-оксопиперазинил, 2-оксопиперидинил, 2-оксопирролодинил, 2-оксоазепинил, азепинил, 4-пиперидонил, тетрагидропиранил, морфолинил, тиаморфолинил, тиаморфолинилсульфоксид, тиаморфолинилсульфон, 1,3-диоксолан, тетрагидро-1,1-диоксотиенил, дигидроизоиндолил и тетрагидрохинолинил.

Термин «гетероарил» относится к замещенным и незамещенным ароматическим 5- -или 6-членным моноциклическим группам и 9-или 10-членным бициклическим группам, которые содержат по меньшей мере один гетероатом (O, S или N) по меньшей мере в одном из колец, при этом указанное содержащее гетероатом кольцо предпочтительно имеет 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из O, S и/или N. Каждое кольцо гетероарильной группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее количество гетероатомов в каждом кольце равно четырем или менее, и каждое кольцо имеет по меньшей мере один атом углерода. Слитые кольца, завершающие бициклическую группу, являются ароматическими и могут содержать только атомы углерода. Атомы азота и серы

могут быть необязательно окислены, и атомы азота необязательно могут быть кватернизированы. Бициклические гетероарильные группы должны включать только ароматические кольца. Гетероарильная группа может быть присоединена к любому доступному атому азота или углерода любого кольца. Гетероарильная кольцевая система может быть незамещенной или может содержать один или несколько заместителей.

Примеры моноциклических гетероарильных групп включают пирролил, пиразолил, пиразолинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, тиадиазолил, изотиазолил, фуранил, тиофенил, оксадиазолил, пиридинил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил и триазинил.

Примеры бициклических гетероарильных групп включают индолил, бензотиазолил, бензодиоксолил, бензоксазолил, бензотиенил, хинолинил, тетрагидроизохинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, бензопиранил, индолизинил, бензофуранил, хромонил, кумаринил, бензопиранил, циннолинил, хиноксалинил, индазолил и пирролопиридил.

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

Соединения формулы (I) могут образовывать соли, которые также входят в объем настоящего изобретения. Если не указано иное, подразумевается, что ссылка на соединение по изобретению включает ссылку на одну или несколько его солей. Термин «соль(и)» обозначает кислые и/или основные 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 основную часть, такую как аминовое или пиридиновое или имидазольное кольцо, так и кислотную часть, например, карбоновая кислота. Предпочтительны фармацевтически приемлемые (т.е. нетоксичные, физиологически приемлемые) соли, такие как, например, приемлемые соли металлов и аминов, в которых катион не вносит значительного вклада в

токсичность или биологическую активность соли. Однако, могут быть применимы и другие соли, например, на стадиях выделения или очистки, которые можно использовать во время получения и, таким образом, они входят в объем изобретения. Соли соединений формулы (I) могут быть образованы, например, путем взаимодействия 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 с уксусной кислотой или тригалогенуксусной кислотой, например, трифторуксусная кислота), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, фумараты, глюкогептаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образованные с соляной кислотой), гидробромиды (образованные 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, образованные с серной кислотой), сульфонаты (например, упомянутые в настоящем документе), тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты, такие как тозилаты, ундеканоаты и тому подобное

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'-дибензилэтилен-диамин, дегидроабиетиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, дициклогексиламин или подобные фармацевтически приемлемые амины и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.п. Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизированы такими средствами, как низшие алкилгалогениды (например, метил, этил, пропил и бутилхлориды, бромиды и йодиды),

диалкилсульфаты (например, диметил, диэтил, дибутил и диамилсульфаты), длинные цепные 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 формулы (I) могут быть представлены в виде аморфных твердых веществ или кристаллических твердых веществ. Лиофилизацию можно использовать для получения соединений формулы (I) в виде твердого вещества.

Кроме того, следует понимать, что сольваты (например, гидраты) соединений формулы (I) также входят в объем настоящего изобретения. Термин «сольват» означает физическую ассоциацию соединения формулы (I) с одной или несколькими молекулами растворителя, органического или неорганического. Такая физическая ассоциация включает водородные связи. В некоторых случаях сольват может быть выделен, например, когда одна или несколько молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. «Сольват» включает как сольваты в фазе раствора, так и выделяемые сольваты. Примеры сольватов включают гидраты, этаноляты, метанолаты, изопропанолаты, сольваты с ацетонитрилом и сольваты с этилацетатом. Способы сольватации известны в данной области техники.

Различные формы пролекарств известны в данной области и описаны в Rautio, J. et al., *Nature Review Drug Discovery,* 17, 559-587 (2018).

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

«Стабильное соединение» и «стабильная структура» предназначены для обозначения соединения, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси и приготовление в виде эффективного терапевтического средства. Настоящее изобретение предназначено для воплощения стабильных соединений.

«Терапевтически эффективное количество» включает количество соединения по настоящему изобретению отдельно или количество комбинации заявленных соединений или количество соединения по настоящему изобретению в комбинации с другими активными ингредиентами, эффективными для действия в качестве ингибитора DGKα и/или DGKζ , или эффективными для лечения или профилактики вирусных инфекций и пролиферативных нарушений, таких как рак.

Используемый в настоящем документе термин «лечить» или «лечение» охватывает лечение болезненного состояния у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (a) предотвращение возникновения болезненного состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к болезненному состоянию, но еще не диагностировано; (b) торможение болезненного состояния, т.е. остановку его развития; и/или (c) облегчение болезненного состояния, т.е. вызывание регрессии болезненного состояния.

Предполагается, что соединения по настоящему изобретению включают все изотопы атомов, встречающихся в соединениях по настоящему изобретению. Изотопы включают атомы, имеющие одинаковый атомный номер, 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. Соединения по изобретению, меченные изотопами, как правило, могут быть получены с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных описанным в настоящем документе, с использованием соответствующего реагента, меченного изотопами, вместо в противном случае используемого немеченого реагента.

Соединения в соответствии с формулой (I) и/или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить любым способом, подходящим для состояния, подлежащего лечению, которое может зависеть от необходимости лечения в конкретном месте или количества соединения формулы (I), которое должно быть доставлено.

Данное изобретение также охватывает класс фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемые соли; и один или несколько нетоксичных, фармацевтически приемлемых носителей, и/или разбавителей, и/или адъювантов (обозначаемых в настоящем описании как

«материалы-носители») и, при желании, другие активные ингредиенты. Соединения формулы (I) можно вводить любым подходящим путем, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, адаптированной к такому пути, и в дозе, эффективной для предполагаемого лечения. Соединения и композиции по настоящему изобретению можно, например, вводить перорально, через слизистую оболочку или парентерально, включая внутрисосудистое, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное и интрастернальное введение в стандартных лекарственных формах, содержащих обычные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и наполнители. Например, фармацевтический носитель может содержать смесь маннита или лактозы и микрокристаллической целлюлозы. Смесь может содержать дополнительные компоненты, такие как смазывающее средство, например, стеарат магния, и разрыхлитель, такой как кросповидон. Смесь-носитель 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 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 обеспечена в виде таблетки или капсулы, содержащей количество активного ингредиента в диапазоне от около 0,1 до 1000 мг, предпочтительно от около 0,25 до 250 мг и более предпочтительно от около 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 способов.

Любая фармацевтическая композиция, рассматриваемая в настоящем документе, может быть доставлена, например, перорально посредством любых приемлемых и подходящих пероральных препаратов. Примеры пероральных препаратов включают, но не ограничиваются ими, например, таблетки, пастилки, леденцы, 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 приготовлены любыми способами, известными в данной области техники для производства фармацевтических композиций, предназначенных для перорального введения. Для получения фармацевтически привлекательных препаратов фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением может содержать по меньшей мере одно средство, выбранное из подсластителей, ароматизаторов, красителей, смягчающих средств, антиоксидантов и консервантов.

Таблетку можно, например, приготовить путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, подходящим для изготовления таблеток. Примеры вспомогательных веществ включают, но не ограничиваются ими, например, инертные разбавители, такие как, например, карбонат кальция, карбонат натрия, лактозу, фосфат кальция и фосфат натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие средства, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, кукурузный крахмал и альгиновая кислота; связующие средства, такие как, например, крахмал, желатин, поливинилпирролидон и аравийская камедь; и смазывающие средства, такие как, например, стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. Кроме того, таблетка может быть либо непокрытой, либо покрытой известными способами либо для 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 времени. период. Примеры водорастворимых материалов, маскирующих вкус, включают, но не ограничиваются ими, гидроксипропилметилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу. Примеры материалов с временной задержкой включают, но не ограничиваются ими, этилцеллюлозу и бутират ацетата целлюлозы.

Твердые желатиновые капсулы можно, например, приготовить путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его соли по меньшей мере с одним инертным твердым разбавителем, таким как, например, карбонат кальция; фосфат кальция; и каолин.

Мягкие желатиновые капсулы можно, например, приготовить путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) 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 с 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 формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним вспомогательным веществом, подходящим для приготовления водной суспензии. Примеры вспомогательных веществ, подходящих для изготовления водной суспензии, включают, но не ограничиваются ими, например, суспендирующие средства, такие как, например, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, альгиновая кислота, поливинилпирролидон, трагакантная камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие средства, такие как, например, встречающийся в природе фосфатид, например, лецитин; продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, такие как, например, полиоксиэтилен-стеарат; продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, такие как, например, гептадекаэтилен-оксицетанол; продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, получающимися из жирных кислот и гекситола, такие как, например, полиоксиэтиленсорбитолмоноолеат; и продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами жирных кислот и ангидридов гекситола, такие как, например, полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водная суспензия также может содержать по меньшей мере один консервант, такой как, например, этил- и н-пропил-п-гидроксибензоат; по меньшей мере один краситель; по меньшей мере один ароматизатор; и/или по меньшей мере один подсластитель, включая, но не ограничиваясь ими, например, сахарозу, сахарин и аспартам.

Масляные суспензии можно, например, приготовить путем суспендирования по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли либо в растительном масле, таком как, например, арахисовое масло; оливковое масло; кунжутное масло; и кокосовое масло; либо 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 не ограничиваясь этим, например, антиоксидант, такой как, например, бутилированный гидроксианизол и альфа-токоферол.

Диспергируемые порошки и гранулы можно, например, приготовить путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним диспергирующим и/или смачивающим средством; по меньшей мере с одним суспендирующим средством; и/или по меньшей мере с одним консервантом. Подходящие диспергирующие средства, смачивающие средства и суспендирующие средства уже описаны выше. Примеры консервантов включают, но не ограничиваются ими, например, антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту. Кроме того, диспергируемые порошки и гранулы также могут содержать по меньшей мере одно вспомогательное вещество, включая, но не ограничиваясь ими, например, подсластители; ароматизаторы; и красящие вещества.

Эмульсия по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли может быть приготовлена, например, в виде эмульсии масло-в-воде. Масляная фаза эмульсий, содержащих соединения формулы (I), может быть составлена из известных ингредиентов известным способом. Масляная фаза может быть обеспечена, но не ограничивается ими, например, растительным маслом, таким как, например, оливковое масло и арахисовое масло; минеральным маслом, таким как, например, жидкий парафин; и их смесями. Хотя фаза может содержать только эмульгатор, она может включать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом или как с жиром, так и с маслом. Подходящие эмульгаторы включают, но не ограничиваются ими, например, встречающиеся в природе фосфатиды, 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 эфиров с этиленоксидом, такие как, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. 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 составляют так называемый эмульгирующий воск, и воск вместе с маслом и жиром составляют так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует маслянистую дисперсную фазу рецептуры кремов. Эмульсия может также содержать подсластитель, ароматизатор, консервант и/или антиоксидант. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для использования в составе по настоящему изобретению, 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 техники.

Соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одна их фармацевтически приемлемая соль могут, например, также вводиться внутривенно, подкожно и/или внутримышечно в любой фармацевтически приемлемой и подходящей форме для инъекций. Типичные формы для инъекций включают, но не ограничиваются ими, например, 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. Данные 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 средств и суспендирующих средств. 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 (т.е. каптизол), солюбилизацию сорастворителем (например, пропиленгликоль) или мицеллярную солюбилизацию (например, твин 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 данной 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 формулы (I) в масляной фазе, такой как, например, смесь соевого масла и лецитина; 2) объединения масляной фазы, содержащей формулу (I), со смесью воды и глицерина; и 3) обработки комбинации с образованием микроэмульсии.

Стерильная водная или масляная суспензия может быть приготовлена в соответствии со способами, уже известными в данной области техники. 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 по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарств (SEDDS), такие как d-альфа-токоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических лекарственных формах, такие как Tween, полиэтоксилированное касторовое масло, такое как поверхностно-

активное вещество CREMOPHOR (BASF), или другие подобные полимерные матрицы для доставки, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов 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, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен-блок-полимеры, полиэтиленгликоль и шерстяной жир. Циклодекстрины, такие как альфа-, бета- и гамма-циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксиалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропилциклодекстрины, или другие солюбилизированные производные, также могут быть успешно использованы для улучшения доставки соединений формул, описанных в настоящем документе.

Фармацевтически активные соединения по данному изобретению могут быть переработаны 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 средства, 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 средства и отдушки.

Количество вводимых соединений и режим дозирования для лечения болезненного состояния с помощью соединений и/или композиций по настоящему изобретению зависят от множества факторов, включая возраст, массу тела, пол, состояние здоровья субъекта, тип болезни, тяжести болезни, путь и частоту введения, и от конкретного используемого соединения. Таким образом, режим дозирования может варьироваться в широких пределах, но его можно определить рутинно с использованием стандартных способов. Подходящей может быть суточная

доза от около 0,001 до 100 мг/кг массы тела, предпочтительно от около 0,0025 до около 50 мг/кг массы тела и наиболее предпочтительно от около 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 активные соединения по настоящему изобретению обычно комбинируют с одним или несколькими адъювантами, подходящими для назначенного 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, гуммиарабиком, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом, и затем таблетированы или инкапсулированы для удобного введения. Такие капсулы или таблетки могут содержать состав с контролируемым высвобождением, который может быть обеспечен в виде дисперсии активного соединения в гидроксипропилметилцеллюлозе.

Фармацевтические композиции по данному изобретению содержат по меньшей мере одно соединение формулы (I) и/или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль и необязательно дополнительное средство, выбранное из любого фармацевтически приемлемого носителя, адъюванта и наполнителя. Альтернативные композиции по данному изобретению содержат соединение формулы (I), описанное в данном документе, или его пролекарство, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

ПОЛЕЗНОСТЬ

Соединения формулы (I) применимы для лечения рака.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинированному препарату соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли, его стереоизомера или таутомера и дополнительного терапевтического средства (средств) для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении и/или профилактике множественных заболеваний или нарушений, связанных с ингибированием мишени DGK в Т-клетках.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего или предрасположенного к заболеванию, которое связано с ингибированием мишени DGK в Т-клетках. Можно лечить ряд заболеваний. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль, его стереоизомер или таутомер. Например, описанные в настоящем документе соединения можно применять для лечения или профилактики вирусных инфекций и пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Соединения формулы (I) и фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение формулы (I), применимы для лечения или профилактики любых заболеваний или состояний, которые связаны с ингибированием мишени DGK в Т-клетках. К ним относятся вирусные и другие инфекции (например, кожные инфекции, желудочно-кишечные инфекции, инфекции мочевыводящих путей, мочеполовые инфекции, системные инфекции) и пролиферативные заболевания (например, рак). Соединения формулы (I) и фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение формулы (I), можно вводить животным, предпочтительно млекопитающим (например, домашним животным, кошкам, собакам, мышам, крысам) и более предпочтительно людям. Для доставки соединения или фармацевтической композиции пациенту может быть использован любой способ введения. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, соединение формулы (I), вводят перорально. В других вариантах осуществления формулу (I) или фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, соединение формулы (I), вводят парентерально.

Соединения формулы (I) могут ингибировать активность диацилглицеролкиназы альфа и дзета (DGKα/ζ). Например, соединения формулы (I) можно использовать для ингибирования активности DGKα и DGKζ в клетке или у индивидуума, нуждающегося в модуляции DGKα и DGKζ, путем введения ингибирующего количества соединения формулы (I) или его соли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения заболеваний, связанных с активностью или экспрессией, включая аномальную

активность и/или сверхэкспрессию, DGKα и DGKζ у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы соединения формулы (I) или его фармацевтической композиции. Примеры заболеваний могут включать любое заболевание, расстройство или состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью фермента DGKα и DGKζ, такое как избыточная экспрессия или аномальная активность. Заболевание, связанное с DGKα и DGKζ, также может включать любое заболевание, расстройство или состояние, которое можно предотвратить, улучшить или вылечить путем модулирования активности ферментов DGKα и DGKζ. Примеры заболеваний, связанных с DGKα и DGKζ, включают рак и вирусные инфекции, такие как ВИЧ-инфекция, гепатит В и гепатит С.

В одном аспекте соединение(я) формулы (I) вводят последовательно перед введением иммуноонкологического средства. В другом аспекте соединение(я) формулы (I) вводят одновременно с иммуноонкологическим средством. В еще одном аспекте соединение(я) формулы (I) вводят последовательно после введения иммуноонкологического средства.

В другом аспекте соединения формулы (I) могут быть включены в состав совместно с иммуноонкологическим средством.

Иммуноонкологические средства включают, например, низкомолекулярный лекарственный препарат, антитело или другое биологическое или низкомолекулярное вещество. Примеры биологических иммуноонкологических средств включают, но не ограничиваются ими, противораковые вакцины, антитела и цитокины. В одном аспекте антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте моноклональное антитело является гуманизированным или человеческим.

В одном аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой (i) агонист стимулирующего (включая костимулирующий) рецептора или (ii) антагонист ингибирующего (включая коингибирующий) сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов (часто называемых регуляторами иммунных контрольных точек).

Некоторые стимулирующие и ингибирующие молекулы являются членами

суперсемейства иммуноглобулинов (immunoglobulin super family (IgSF)). Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством связанных с мембраной лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с родственными членами семейства рецепторов TNF, которое включает CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTβR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α/TNFβ, TNFR2, TNFα, LTβR, лимфотоксин α 1β2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В одном аспекте ответы Т-клеток можно стимулировать комбинацией соединения формулы (I) и одного или нескольких из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунных контрольных точек), например, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, например, B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Другие средства, которые можно комбинировать с соединениями формулы (I) для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, соединения формулы (I) можно комбинировать с антагонистами KIR, такими как лирилумаб.

Другие средства для комбинированной терапии включают средства, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая, но не ограничиваясь ими, антагонисты CSF-1R, такие как антитела-антагонисты CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

В другом аспекте соединения формулы (I) могут быть использованы с одним

или несколькими средствами-агонистами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими средствами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистами и одним или более средствами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют ингибирующее взаимодействие с рецептором (например, взаимодействие PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, с помощью моноклонального антитела против CD25 (например, даклизумаб) или путем истощения гранулами анти-CD25 ex vivo), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток) и средствами, которые вызывают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в местах опухоли.

В одном аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CTLA-4, такой как антагонистическое антитело к CTLA-4. Подходящие антитела к CTLA-4 включают, например, YERVOY (ипилимумаб) или тремелимумаб.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист PD-1, такой как антагонистическое антитело к PD-1. Подходящие антитела к PD-1 включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Иммуноонкологическое средство может также включать пидилизумаб (CT-011), хотя его специфичность в отношении связывания PD-1 подвергается сомнению. Другим подходом к нацеливанию на рецептор PD-1 является рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист PD-L1, такой как антагонистическое антитело к PD-L1. Подходящие антитела против PD-L1 включают, например, MPDL3280A (RG7446; WO2010/077634), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874) и MSB0010718C (WO2013/79174).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист LAG-3, такой как антагонистическое антитело к LAG-3. Подходящие

антитела к LAG3 включают, например, BMS-986016 (WO10/19570, WO14/08218) или IMP-731 или IMP-321 (WO08/132601, WO09/44273).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое антитело к CD137. Подходящие антитела к CD137 включают, например, урелумаб и PF-05082566 (WO12/32433).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист GITR, такой как антитело-агонист к GITR. Подходящие антитела к GITR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116) и MK-4166 (WO11/028683).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, BMS-986205 или NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO 12/142237).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают, например, MEDI-6383 или MEDI-6469.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист OX40L, такой как антагонистическое антитело к OX40. Подходящие антагонисты к OX40L включают, например, RG-7888 (WO 06/029879).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD40, такой как агонистическое антитело к CD40. В еще одном варианте осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело к CD40. Подходящие антитела к CD40 включают, например, лукатумумаб или дацетузумаб.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают, например, варлилумаб.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой MGA271 (к B7H3) (WO11/109400).

Комбинированная терапия предназначена для введения данных терапевтических средств последовательным образом, то есть, когда каждое терапевтическое средство вводят в разное время, а также для введения данных

терапевтических средств или по меньшей мере двух терапевтических средств по существу одновременным образом. По существу одновременное введение может быть достигнуто, например, путем введения субъекту одноразовой лекарственной формы, имеющей фиксированное соотношение каждого терапевтического средства, или нескольких одноразовых лекарственных форм для каждого из терапевтических средств. Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического средства можно осуществлять любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный путь, внутривенный путь, внутримышечный путь и прямое всасывание через ткани слизистой оболочки. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первое терапевтическое средство из выбранной комбинации можно вводить внутривенной инъекцией, в то время как другие терапевтические средства из комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические средства можно вводить перорально или все терапевтические средства можно вводить внутривенной инъекцией. Комбинированная терапия также может включать введение терапевтических средств, как описано выше, в дополнительной комбинации с другими биологически активными ингредиентами и немедикаментозными способами лечения (например, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). Если комбинированная терапия дополнительно включает немедикаментозное лечение, то немедикаментозное лечение может проводиться в любое подходящее время, пока достигается благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических средств и немедикаментозного лечения. Например, в соответствующих случаях благоприятный эффект все еще достигается, когда немедикаментозное лечение временно отменяется, возможно, на несколько дней или даже недель.

Используемый в настоящем документе термин «клетка» относится к клетке, находящейся *in vitro, ex vivo* или *in vivo.* В некоторых вариантах осуществления клетка *ex vivo* может быть частью образца ткани, вырезанного из организма, такого как млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления клетка *in vitro* может представлять собой клетку в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления клетка *in vivo* представляет собой клетку, живущую в организме, таком как млекопитающее.

Используемый в настоящем документе термин «введение в контакт» относится к соединению указанных частей в системе *in vitro* или системе *in vivo.* Например, «введение в контакт» фермента DGKα и DGKζ с соединением формулы (I) включает введение соединения по настоящему изобретению индивидууму или пациенту, такому как человек, имеющему DGKα и DGKζ, а также, например, введение соединения формулы (I) в пробу, содержащую клеточный или очищенный препарат, содержащий фермент DGKα и DGKζ.

Термин «ингибитор DGKα и DGKζ» относится к средству, способному ингибировать активность диацилглицеролкиназы альфа и/или диацилглицеролкиназы дзета (DGKα и DGKζ) в Т-клетках, что приводит к стимуляции Т-клеток. Ингибитор DGKα и DGKζ может быть обратимым или необратимым ингибитором DGKα и DGKζ. «Обратимый ингибитор DGKα и DGKζ» представляет собой соединение, которое обратимо ингибирует ферментативную активность DGKα и DGKζ либо в каталитическом, либо в некаталитическом центре, и «необратимый ингибитор DGKα и DGKζ» представляет собой соединение, которое необратимо разрушает активность ферментов DGKα и DGKζ, образуя ковалентную связь с ферментом.

Типы раковых заболеваний, которые можно лечить соединением формулы (I), включают, но не ограничиваются ими, рак головного мозга, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак крови, рак легких и рак костей. Примеры таких типов рака включают нейробластому, карциному кишечника, такую как карцинома прямой кишки, карцинома толстой кишки, семейный аденоматозный полипозный рак и наследственный неполипозный колоректальный рак, карциному пищевода, карциному губ, карциному гортани, карциному гортаноглотки, карциному языка, карциному слюнных желез, карциному желудка, аденокарциному, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, карциному почки, паренхиматозный рак почки, карциному яичника, карциному шейки матки, карциному тела матки, карциному эндометрия, карциному хориона, карциному поджелудочной железы, карциному предстательной железы, карциному яичка, карциному молочной железы, карциному

мочевого пузыря, меланому, опухоли головного мозга, такие как глиобластома, астроцитома, менингиома, медуллобластома и периферические нейроэктодермальные опухоли, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, острый лимфатический лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфатический лейкоз (ХЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), Т-клеточный лейкоз/лимфому у взрослых, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), гепатоцеллюлярную карциному, карциному желчного пузыря, карциному бронхов, мелкоклеточную карциному легкого, немелкоклеточную карциному легкого, множественную миелому, базалиому, тератому, ретинобластому, хориоидальную меланому, семиному, рабдомиосаркому, краниофарингиому, остеосаркому, хондросаркому, миосаркому, липосаркому, фибросаркому, саркому Юинга и плазмоцитому.

Одно или несколько дополнительных фармацевтических средств или способов лечения, таких как, например, противовирусные средства, химиотерапевтические средства или другие противораковые средства, иммуностимуляторы, иммунодепрессанты, облучение, противоопухолевые и противовирусные вакцины, цитокиновая терапия (например, IL2 и GM-CSF) и/или ингибиторы тирозинкиназы могут быть необязательно использованы в комбинации с соединениями формулы (I) для лечения DGKα– и DGKζ-сопутствующих заболеваний, расстройств или состояний. Средства можно комбинировать с настоящими соединениями в одноразовой лекарственной форме или средства можно вводить одновременно или последовательно в виде отдельных лекарственных форм.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые средства включают, например, алкилирующие средства (включая, без исключения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены), такие как урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN®), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтилен-меламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

При лечении меланомы подходящие средства для применения в сочетании с соединениями формулы (I) включают: дакарбазин (DTIC), необязательно, вместе с другими химиотерапевтическими препаратами, такими как кармустин (BCNU) и

цисплатин; «Дартмутскую схему лечения», состоящую из DTIC, BCNU, цисплатина и тамоксифена; комбинацию цисплатина, винбластина и DTIC, темозоломида или YERVOY™. Соединения формулы (I) можно также комбинировать с иммунотерапевтическими препаратами, включая цитокины, такие как интерферон-альфа, интерлейкин-2 и фактор некроза опухоли (ФНО), при лечении меланомы.

Соединения формулы (I) также могут быть использованы в сочетании с вакцинной терапией при лечении меланомы. Вакцины против меланомы в некотором роде аналогичны антивирусным вакцинам, которые используются для предотвращения заболеваний, вызываемых вирусами, такими как полиомиелит, корь и эпидемический паротит. Ослабленные клетки меланомы или части клеток меланомы, называемые антигенами, могут быть введены пациенту, чтобы стимулировать иммунную систему организма к разрушению клеток меланомы.

Меланомы, расположенные на руках или ногах, также можно лечить комбинацией средств, включающих одно или несколько соединений формулы (I), с использованием методики гипертермической изолированной перфузии конечности. Данный протокол лечения временно отделяет кровообращение пораженной конечности от остального тела и вводит высокие дозы химиотерапии в артерию, питающую конечность, таким образом обеспечивая высокие дозы в области опухоли, не подвергая внутренние органы воздействию таких доз, которые в противном случае могли бы вызвать тяжелые побочные эффекты. Обычно жидкость нагревается до от 38,9 °C до 40 °C. Мелфалан представляет собой препарат, наиболее часто используемый в данной химиотерапевтической процедуре. Он может быть введен с другим средством, называемым фактором некроза опухоли (tumor necrosis factor (TNF)).

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые средства включают, например, антиметаболиты (включая, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы), такие как метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые средства дополнительно включают, например, некоторые природные продукты и их

производные (например, алкалоиды барвинка, противоопухолевые антибиотики, ферменты, лимфокины и эпиподофиллотоксины), такие как винбластин, винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, ara-C, паклитаксел (таксол), митрамицин, дезоксико-формицин, митомицин-С, L-аспарагиназу, интерфероны (особенно IFN-a), этопозид и тенипозид.

Другие цитотоксические средства включают навельбен, CPT-11, анастразол, летразол, капецитабин, релоксафин и дролоксафин.

Также подходящими являются цитотоксические средства, такие как эпидофиллотоксин; противоопухолевый фермент; ингибитор топоизомеразы; прокарбазин; митоксантрон; координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин; модификаторы биологического ответа; ингибиторы роста; антигормональные терапевтические средства; лейковорин; тегафур; и гемопоэтические факторы роста.

Другие противораковые средства включают терапевтические антитела, такие как трастузумаб (HERCEPTIN®), антитела к костимулирующим молекулам, таким как CTLA-4, 4-1BB и PD-1, или антитела к цитокинам (IL-10 или TGF-β).

Другие противораковые средства также включают те, которые блокируют миграцию иммунных клеток, такие как антагонисты рецепторов хемокинов, включая CCR2 и CCR4.

Другие противораковые средства также включают те, которые усиливают иммунную систему, такие как адъюванты или адоптивный перенос Т-клеток.

Противораковые вакцины включают дендритные клетки, синтетические пептиды, ДНК-вакцины и рекомбинантные вирусы.

Фармацевтическая композиция по изобретению может необязательно включать по меньшей мере один ингибитор сигнальной трансдукции (signal transduction inhibitor (STI)). «Ингибитор сигнальной трансдукции» представляет собой средство, которое избирательно ингибирует одну или несколько жизненно важных стадий сигнальных путей в нормальной функции раковых клеток, тем самым приводя к апоптозу. Подходящие STI включают, но не ограничиваются ими: (i) ингибиторы киназы bcR/abl, такие как, например, STI 571 (GLEEVEC®); (ii) ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGF), такие как, например,

ингибиторы киназы (IRESSA®, SSI-774) и антитела (Imclone: C225 [Goldstein et al., *Clin. Cancer Res.*, 1:1311-1318 (1995)] и Abgenix: ABX-EGF); (iii) ингибиторы рецепторов her-2/neu, такие как ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI), такие как, например, L-744832 (Kohl et al., *Nat. Med.*, 1(8):792-797 (1995)); (iv) ингибиторы киназ семейства Akt или пути Akt, такие как, например, рапамицин (см., например, Sekulic et al., *Cancer Res.*, 60:3504-3513 (2000)); (v) ингибиторы киназы клеточного цикла, такие как, например, флавопиридол и UCN-01 (см., например, Sausville, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 3:47-56 (2003)); и (vi) ингибиторы фосфатидилинозитолкиназы, такие как, например, LY294002 (см., например, Vlahos et al., *J. Biol. Chem.*, 269:5241-5248 (1994)). Альтернативно, по меньшей мере один STI и по меньшей мере одно соединение формулы (I) могут находиться в отдельных фармацевтических композициях. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI можно вводить пациенту одновременно или последовательно. Другими словами, сначала можно вводить по меньшей мере одно соединение формулы (I), сначала можно вводить по меньшей мере один STI, или одновременно можно вводить по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI. Кроме того, когда используется более одного соединения формулы (I) и/или STI, соединения можно вводить в любом порядке.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения хронической вирусной инфекции у пациента, содержащую по меньшей мере одно соединение формулы (I), необязательно, по меньшей мере одно химиотерапевтическое лекарственное средство и, необязательно, по меньшей мере одно противовирусное средство в фармацевтически приемлемом носителе.

Также обеспечен способ лечения хронической вирусной инфекции у пациента путем введения эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения пациенту одновременно или последовательно вводят по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство. Другими словами, по меньшей мере одно соединение формулы (I) может быть введено первым, по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство может быть введено

первым, или по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI могут быть введены одновременно. Кроме того, когда используется более одного соединения формулы (I) и/или химиотерапевтического средства, соединения можно вводить в любом порядке. Подобным образом, любое противовирусное средство или STI также можно вводить в любой момент по сравнению с введением соединения формулы (I).

Хронические вирусные инфекции, которые можно лечить с помощью настоящего комбинированного лечения, включают, но не ограничиваются ими, заболевания, вызванные: вирусом гепатита С (ВГС), вирусом папилломы человека (ВПЧ), цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом простого герпеса (ВПГ), вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирусом ветряной оспы, вирусом Коксаки, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Примечательно, что паразитарные инфекции (например, малярию) также можно лечить указанными выше способами, в которых соединения, известные для лечения паразитарных состояний, необязательно добавляют вместо противовирусных средств.

Подходящие противовирусные средства, предполагаемые для применения в комбинации с соединением формулы (I), могут включать нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), протеазные ингибиторы и другие противовирусные лекарственные средства.

Примеры подходящих НИОТ включают зидовудин (AZT); диданозин (ddI); зальцитабин (ddC); ставудин (d4T); ламивудин (3TC); абакавир (1592U89); адефовир дипивоксил [бис(POM)-PMEA]; лобукавир; BCH-I0652; эмитрицитабин [(-)-FTC]; бета-L-FD4 (также называемый бета-L-D4C или бета-L-2',3'-диклеокси-5-фторцитиден); DAPD, ((-)-бета-D-2,6-диаминопуриндиоксолан); и лоденозин (FddA). Типичные подходящие ННИОТ включают невирапин (BI-RG-587); делавирадин (BHAP, U-90152); эфавиренц (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442 (1-(этоксиметил)-5-(1-метилэтил)-6-(фенилметил)-(2,4(1H,3H)-пиримидиндион) и (+)-каланолид A (NSC-675451) и B. Типичные подходящие ингибиторы протеазы включают саквинавир (Ro 31-8959), ритонавир (ABT-538), индинавир (MK-639), нелфнавир (AG-1343), ампренавир (141W94), лазинавир, DMP-450, BMS-2322623, ABT-378 и AG-1549. Другие противовирусные средства включают

гидроксимочевину, рибавирин, IL-2, IL-12, пентафузид и Yissum Project No.11607.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические наборы, применимые, например, для лечения или профилактики DGKα– and DGKζ–сопутствующих заболеваний или расстройств и других заболеваний, упомянутых в настоящем документе, которые включают один или несколько контейнеров, содержащих фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество соединения формулы (I). Такие наборы могут дополнительно включать, при желании, один или несколько различных компонентов обычных фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Инструкции в виде вкладышей или этикеток с указанием количества вводимых компонентов, рекомендации по применению и/или рекомендации по смешиванию компонентов также могут быть включены в набор.

Комбинированная терапия предназначена для введения данных терапевтических средств последовательным образом, то есть, когда каждое терапевтическое средство вводят в разное время, а также для введения данных терапевтических средств или по меньшей мере двух терапевтических средств по существу одновременным образом. По существу одновременное введение может быть достигнуто, например, путем введения субъекту одноразовой лекарственной формы, имеющей фиксированное соотношение каждого терапевтического средства, или нескольких одноразовых лекарственных форм для каждого из терапевтических средств. Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического средства можно осуществлять любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный путь, внутривенный путь, внутримышечный путь и прямое всасывание через ткани слизистой оболочки. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первое терапевтическое средство из выбранной комбинации можно вводить внутривенной инъекцией, в то время как другие терапевтические средства из комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические средства можно вводить перорально или все терапевтические средства можно вводить внутривенной инъекцией. Комбинированная терапия также

может включать введение терапевтических средств, как описано выше, в дополнительной комбинации с другими биологически активными ингредиентами и немедикаментозными терапиями (например, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). Если комбинированная терапия дополнительно включает немедикаментозное лечение, немедикаментозное лечение можно проводить в любое подходящее время, пока достигается благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических средств и немедикаментозного лечения. Например, в соответствующих случаях благоприятный эффект все еще достигается, когда немедикаментозное лечение временно отменяется, возможно, на несколько дней или даже недель.

Изобретение также относится к фармацевтически приемлемым композициям, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких соединений формулы (I), составленных вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями, и, необязательно, одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, описанными выше.

Соединения по данному изобретению можно вводить для любого из описанных в настоящем документе применений любым подходящим способом, например, перорально, например, в виде таблеток, капсул (каждая из которых включает составы с замедленным или пролонгированным высвобождением), пилюль, порошков, гранул, эликсиров, настоек, суспензий (включая наносуспензии, микросуспензии, высушенные распылением дисперсии), сиропов и эмульсий; сублингвально; щечно; парентерально, например, путем подкожной, внутривенной, внутримышечной или интрастернальной инъекции или способами инфузии (например, в виде стерильных водных или неводных растворов или суспензий для инъекций); назально, включая введение в носовые оболочки, например, с помощью ингаляционного спрея; местно, например, в виде крема или мази; или ректально, например, в виде суппозиториев. Их можно вводить отдельно, но обычно вводят с фармацевтическим носителем, выбранным на основе выбранного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», используемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или

носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное средство, технологическую добавку (например, смазку, тальк, магний, стеарат кальция или цинка или стериновую кислоту), или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или доставке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами состава, включая, например, адъювант, вспомогательное вещество или носитель, такой как разбавители, консерванты, наполнители, средства, регулирующие текучесть, дезинтегрирующие средства, смачивающие средства, эмульгаторы, суспендирующие средства, подсластители, ароматизаторы, отдушки, антибактериальные средства, противогрибковые средства, смазывающие средства и дозирующие средства, в зависимости от характера способа введения и лекарственных форм; и не вредит пациенту.

Термин «фармацевтическая композиция» означает композицию, включающую соединение по изобретению в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным фармацевтически приемлемым носителем.

Фармацевтически приемлемые носители составляют в соответствии с рядом факторов, хорошо известных специалистам в данной области техники. К ним, без исключения, относятся: тип и природа активного средства, изготавливаемого в рецептуре; субъект, которому должна быть введена композиция, содержащая средство; предполагаемый путь введения композиции; и целевое терапевтическое показание. Фармацевтически приемлемые носители включают как водные, так и неводные жидкие среды, а также разнообразные твердые и полутвердые лекарственные формы. Такие носители могут включать ряд различных ингредиентов и добавок в дополнение к активному средству, причем такие дополнительные ингредиенты включаются в состав по целому ряду причин, например, для стабилизации активного средства, связующих веществ и т. д., хорошо известных специалистам в данной области техники. Описания подходящих фармацевтически приемлемых носителей и факторов, участвующих в их выборе, можно найти в различных легкодоступных источниках, таких как, например, Allen, L. V. Jr. *et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2 Volumes)*, 22nd Edition (2012), Pharmaceutical Press.

Режим дозирования соединений по настоящему изобретению, конечно, будет варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного средства и способ и путь его введения; вид, возраст, пол, состояние здоровья, состояние здоровья и масса реципиента; характер и выраженность симптомов; вид сопутствующего лечения; частота лечения; способ введения, почечная и печеночная функция пациента и желаемый эффект.

В качестве общего руководства, суточная пероральная доза каждого активного ингредиента при использовании для достижения указанных эффектов будет варьироваться от около 0,001 до около 5000 мг в день, предпочтительно от около 0,01 до около 1000 мг в день и наиболее предпочтительно от около от 0,1 до около 250 мг в день. При внутривенном введении наиболее предпочтительные дозы будут варьироваться от около 0,01 до около 10 мг/кг/мин во время инфузии с постоянной скоростью. Соединения по данному изобретению можно вводить в виде одноразовой суточной дозы или общую суточную дозу можно вводить в виде разделенных доз два, три или четыре раза в день.

Соединения обычно вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, вспомогательными веществами или носителями (обозначаемые в настоящем документе как фармацевтические носители), подходящим образом выбранными в отношении предполагаемой формы введения, например, пероральными таблетками, капсулами, эликсирами и сиропами, и совместимыми с обычной фармацевтической практикой.

Лекарственные формы (фармацевтические композиции), подходящие для введения, могут содержать от около 1 миллиграмма до около 2000 миллиграммов активного ингредиента на единицу дозирования. В данных фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве около 0,1-95% по массе в расчете на общую массу композиции.

Типичная капсула для перорального введения содержит по меньшей мере одно из соединений по настоящему изобретению (250 мг), лактозу (75 мг) и стеарат магния (15 мг). Смесь пропускают через сито 60 меш и упаковывают в желатиновые капсулы № L.

Типичный препарат для инъекции получают, помещая по меньшей мере одно

из соединений по настоящему изобретению (250 мг) в сосуд в асептических условиях, осуществляя замораживание-сушку и герметизацию в асептических условиях. При применении содержимое сосуда смешивают с 2 мл физиологического раствора с получением препарата для инъекции.

Настоящее изобретение включает в себя фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного ингредиента терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с фармацевтическим носителем. Необязательно, соединения по настоящему изобретению можно использовать отдельно, в комбинации с другими соединениями по настоящему изобретению или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, противораковым средством или другим фармацевтически активным веществом.

Независимо от выбранного пути введения, соединения по настоящему изобретению, которые можно использовать в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению готовят в виде фармацевтически приемлемых дозированных форм обычными способами, известными специалистам в данной области техники.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являющееся токсичным для пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения по настоящему изобретению или его сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения или метаболизма конкретного используемого соединения, скорость и степень абсорбции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретным используемым соединением, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и историю предшествующего лечения пациента, которого лечили, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Врач или ветеринар, обладающие обычными знаниями в данной области техники, могут легко определить и прописать необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринарный врач могут начинать дозировки соединений по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, с уровней ниже тех, которые необходимы для достижения терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока эффект не будет достигнут.

Как правило, подходящей суточной дозой соединения по изобретению будет такое количество соединения, которое представляет собой наименьшую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше. Как правило, пероральные, внутривенные, интрацереброventрикулярные и подкожные дозы соединений по данному изобретению для пациента составляют от около 0,01 до около 50 мг на килограмм массы тела в день.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более поддоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в виде стандартных лекарственных форм. В некоторых аспектах изобретения дозировка составляет одно введение в день.

Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно вводить соединение в виде фармацевтического состава (композиции).

Вышеупомянутые другие терапевтические средства при использовании в комбинации с соединениями по настоящему изобретению могут быть использованы, например, в количествах, указанных в справочнике врачей (Physicians' Desk Reference (PDR)) или как иным образом определено специалистом в данной области техники. В способах по настоящему изобретению такие другие терапевтические средства можно вводить до, одновременно с или после введения соединений по изобретению.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ

Соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы многими

способами, доступными специалистам в области органической химии. Общие синтетические схемы получения соединений по настоящему изобретению описаны ниже. Данные схемы являются иллюстративными и не предназначены для ограничения возможных способов, которые может использовать специалист в данной области техники для получения соединений, описанных в настоящем документе. Специалистам в данной области техники будут очевидны различные способы получения соединений по настоящему изобретению. Примеры соединений по настоящему изобретению, полученных способами, описанными на общих схемах, приведены в разделе «Примеры», приведенном ниже. Получение гомохиральных примеров можно осуществить способами, известными специалисту в данной области техники. Например, гомохиральные соединения могут быть получены разделением рацемических продуктов или диастереомеров с помощью препаративной ВЭЖХ с хиральной фазой. Альтернативно, примеры соединений могут быть получены способами, известными для получения энантиомерно или диастереомерно обогащенных продуктов.

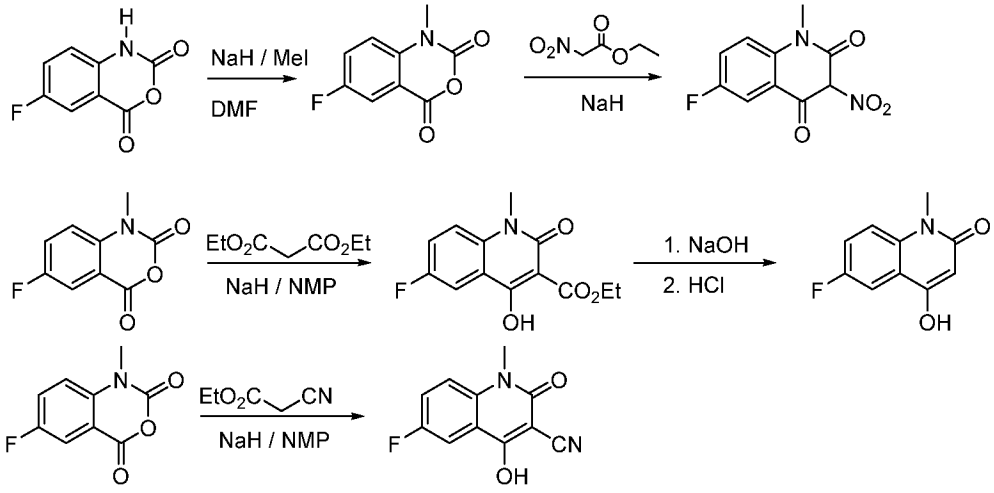
Реакции и методики, описанные в данном разделе, выполняются в растворителях, соответствующих используемым реагентам и материалам, и подходят для осуществляемых превращений. Кроме того, при описании синтетических способов, приведенном ниже, следует понимать, что все предлагаемые условия реакции, включая выбор растворителя, реакционную атмосферу, температуру реакции, продолжительность эксперимента и процедуры обработки, выбраны как стандартные условия для данной реакции, которые должны быть легко распознаны специалистом в данной области техники. Специалисту в области органического синтеза понятно, что функциональная группа, присутствующая в различных частях молекулы, должна быть совместима с предлагаемыми реагентами и реакциями. Такие ограничения на заместители, которые совместимы с условиями реакции, будут очевидны специалисту в данной области техники, при этом в случае присутствия несовместимых заместителей потребуются альтернативы. Иногда для получения соединения по изобретению потребуется изменить порядок синтетических стадий или выбрать одну конкретную технологическую схему вместо другой. Также следует признать, что еще одним важным соображением при планировании любого пути синтеза в данной области

является разумный выбор защитной группы, используемой для защиты реакционноспособных функциональных групп, присутствующих в соединениях, описанных в данном изобретении. Авторитетным отчетом, описывающим множество альтернатив обученному практикующему врачу, является Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, Wiley and Sons (2007).

Методологии, которые можно использовать в синтезе промежуточных соединений, пригодных для получения примеров по настоящему изобретению, показаны на схеме ниже.

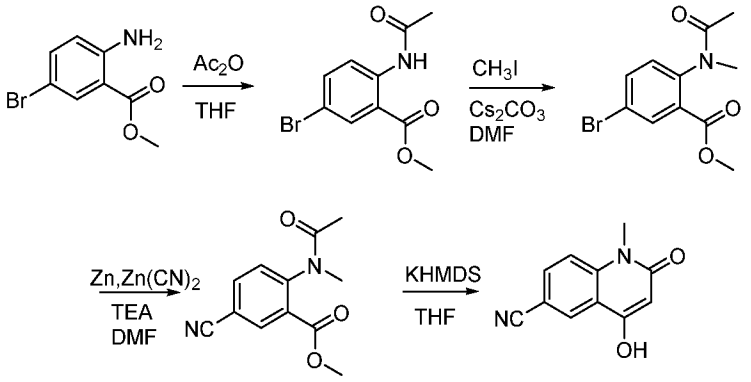
Бензооксазин-2,4(1H)-дионы показанного типа можно обработать сильным основанием и метилирующим реагентом, таким как йодистый метил, с получением 1-метил-2H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4(1H)-дионов. Их можно обрабатывать активированными ацетатами, например нитроацетатами, малонатами и цианоацетатами, с получением 1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1H,3H)-дионов, 1-метил-3-карбоксиэтилхинолин-2,4(1H,3H)-дионов и 1-метил-3-цианохинолин-2,4(1H,3H)-дионов, соответственно. Производные 3-эфира можно дополнительно преобразовать путем основного гидролиза и кислотного декарбоксилирования с получением 6-фтор-4-гидрокси-1-метилхинолин-2(1H)-она.

СХЕМА 1



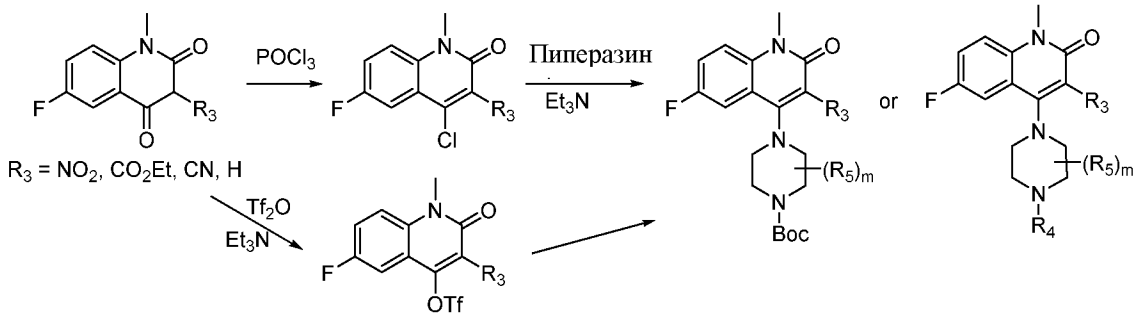
Альтернативно, хинолиндионы могут быть получены из замещенных 2-аминобензойных кислот. Например, метил-2-амино-5-бромбензоат можно преобразовать в 4-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-карбонитрил в четыре стадии.

СХЕМА 2



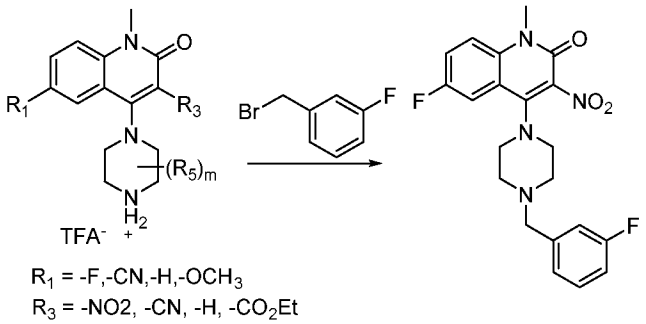
Такие хинолиндионы, в свою очередь, могут быть преобразованы в родственные 4-хлор- или 4-трифлатные производные, которые могут вступать в реакцию с различными функционализированными пиперазинами с получением защищенных соединений, таких как трет-бутил 4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат или примеры по настоящему изобретению.

СХЕМА 3



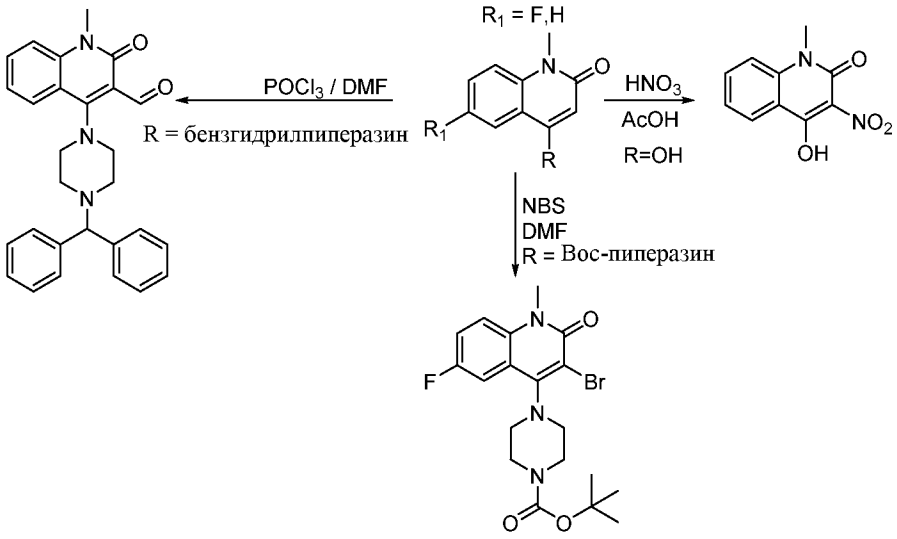
Защищенные пиперазины, такие как трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат, могут быть дополнительно преобразованы путем снятия защиты пиперазина с помощью, например, TFA в дихлорметане и реакции с электрофилом, таким как 3-фторбензилбромид, с получением 6-фтор-4-{4-[(3-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-она.

СХЕМА 4



Соединения по изобретению также могут быть получены реакцией хинолиндионов или аминохинолонов с электрофилами, такими как оксихлорид фосфора в DMF, азотная кислота в уксусной кислоте или N-бромсукцинимид в DMF, с получением, например, 4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегида, 4-гидрокси-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она и трет-бутил-4-(3-бром-6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата, соответственно. Данные соединения могут быть дополнительно преобразованы, если это необходимо, с получением соединений по изобретению. Примеры по изобретению могут быть получены из 4-гидрокси-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она, следуя стадиям, показанным на схеме 3.

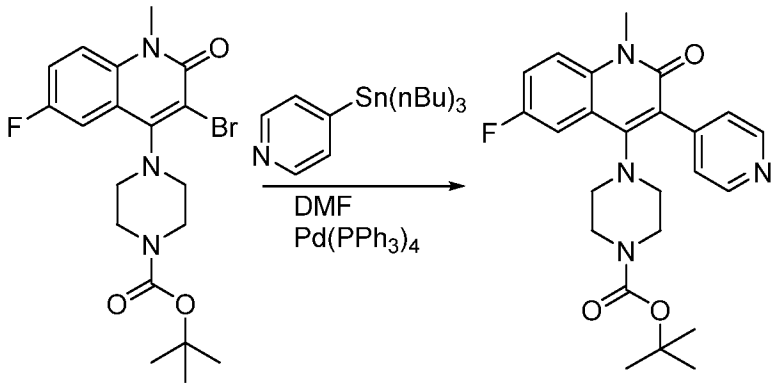
СХЕМА 5



Трет-бутил-4-(3-бром-6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат может вступать в реакцию с арил- и гетероарилбороновыми кислотами или станинами в присутствии подходящего катализатора с получением, например, трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазина-1-карбоксилата. Данные

примеры могут быть дополнительно преобразованы путем снятия защиты и алкилирования пиперазина, как показано на схеме 3.

СХЕМА 6



ПРИМЕРЫ

Следующие примеры иллюстрируют конкретные и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не ограничивают объем настоящего изобретения. Химические аббревиатуры и символы, как и научные аббревиатуры и символы имеют свои обычные и общепринятые значения, если не указано иное. Дополнительные сокращения, используемые в примерах и в других местах данной заявки, определены ниже. Обычные промежуточные соединения обычно используются для получения более чем одного примера и обозначаются последовательно (например, промежуточное соединение 1, промежуточное соединение 2 и т. д.) и обозначаются аббревиатурой Int. 1 или I1, Int. 2 или I2 и т. д. Соединения примеров идентифицируются по примеру и стадии, на которой они были получены (например, «1-A» обозначает пример 1, стадия A), или только по примеру, если соединение является указанным в заголовке соединением примера (например, «1» обозначает указанное в заголовке соединение примера 1). В некоторых случаях описаны альтернативные способы получения промежуточных соединений или примеров. 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 оборудования и уменьшенное количество линейных стадий и

т. д. Целью описания альтернативных препаративных процедур является дополнительное обеспечение возможности приготовления примеров по данному изобретению. В некоторых случаях некоторые функциональные группы в приведенных примерах и формуле изобретения могут быть заменены хорошо известными биоизостерическими заменами, известными в данной области техники, примером чего может служить замена карбоксильной группы тетразольным или фосфатным фрагментом. Данные ^{1}H ЯМР накапливались в дейтерированном диметилсульфоксиде для подавления сигнала воды при обработке данных. Приводимые спектры не скорректированы на эффекты подавления воды. Протоны, поглощающие рядом с частотой подавления воды 3,35 м.д. (ppm, *parts per million),* демонстрируют пониженную интенсивность сигнала.

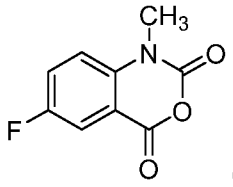
СОКРАЩЕНИЯ

Ac	ацетил
AcOH	уксусная кислота
Ac_2O	уксусный ангидрид
anhyd.	безводный
aq.	водный
Boc	*трет*-бутоксикарбонил
BOP	бензотриазол-1-илокситрис-(диметиламино)-фосфония гексафторфосфат
Bu	бутил
DCM	дихлорметан
DEA	диэтиламин
DIEA или DIPEA	диизопропилэтиламин
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
dppf	1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
Et	этил
Et_3N	триэтиламин
EtOAc	этилацетат

EtOH	этанол
ч, часы или чс.	час(ы)
HCl	соляная кислота
ВЭЖХ	жидкостная хроматография высокого давления
ЖХ	жидкостная хроматография
ЖХМС	жидкостная хроматография-масс-спектрометрия
M	молярный
M^{+1}	$(M+H)^+$
Me	метил
MeI	метилйодид
MeOH	метанол
Mesyl-Cl	метансульфонилхлорид
МГц	мегагерц
мин	минута(ы)
мМ	миллимолярный
МС	масс-спектрометрия
n или N	нормальный
NH_4OAc	ацетат аммония
KHMDS	бис(триметилсилил)амид калия
нМ	наномолярный
NMP	*N*-метилпирролидинон
$Pd_2(dba)_3$	трис-(дибензилиденацетон)дипалладий
pet ether	петролейный эфир
Ph	фенил
$POCl_3$	оксихлорид фосфора
rt или Ret time	время удерживания
насыщ.	насыщенный
TEA	триэтиламин
Тетракис	тетракис(трифенилфосфин)палладий(0)
TFA	трифторуксусная кислота
Tf_2O	трифторметилсульфоновый ангидрид
THF	тетрагидрофуран

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 1

6-фтор-1-метил-2H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4(1H)-дион

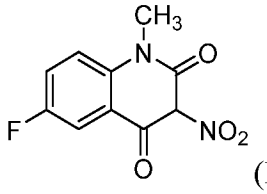


(I-1)

К раствору 6-фтор-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-диона (10,2 г, 56,3 ммоль) в DMFA (60 мл) добавляли порциями 60%-ную дисперсию гидрида натрия (2,70 г, 67,6 ммоль) в минеральном масле при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли метилйодид (4,23 мл, 67,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили водой. К реакционной смеси добавляли диэтиловый эфир. Светло-желтое твердое вещество собирали в виде 6-фтор-1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-диона (9,55 г, 48,9 ммоль, выход 87%). ЖХ/МС Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм. Время удерживания 1,982 мин, 196,0 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,82-7,73 (м, 2H), 7,56-7,46 (м, 1H), 3,47 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 2

6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1H,3H)-дион



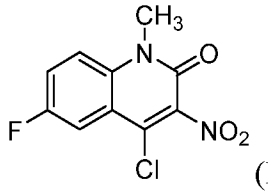
(I-2)

К раствору этилового эфира 2-нитроацетата (3,38 г, 25,4 ммоль) в NMP (15 мл) в круглодонной колбе при 0 °C порциями добавляли 60%-ную дисперсию гидрида натрия (1,107 г, 27,7 ммоль) в минеральном масле. Реакционную смесь

перемешивали в течение 5 минут при 0°C и затем в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 6-фтор-1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (4,5 г, 23,06 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 120 °C в течение 2 часов. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакцию гасили ледяной водой. Реакционную смесь подкисляли 1 н. раствором HCl. Добавляли этиловый эфир и собирали желтое твердое вещество в виде 6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1H,3H)-диона (2,69 г, 11,29 ммоль, выход 49,0%). ЖХ/МС Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 1488 мин, 237,1 ($M-H^-$). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,85 (дд, J = 9,2, 2,6 Гц, 1H), 7,72-7,47 (м, 2H), 6,73 (с, шир., 1H), 3,58 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 3

4-хлор-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он



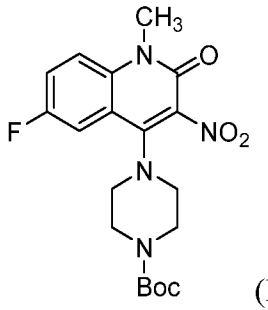
(I-3)

В запаянную пробирку добавляли 6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1H,3H)-дион (1,4 г, 5,88 ммоль) и оксихлорид фосфора (10 мл, 107 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 95°C в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали, остаток выливали на ледяную воду и нейтрализовали насыщенным раствором $NaHCO_3$. Смесь экстрагировали дихлорметаном (2×40 мл) и органические слои объединяли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали с получением 4-хлор-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она в виде оранжевого твердого вещества (1,28 г, 4,99 ммоль, выход 85%). Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при

220 нм Время удерживания 2,648 мин, 257,0 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 7,93 (д, J =9,5 Гц, 1H), 7,86-7,79 (м, 2H), 3,72 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 4

трет-бутил 4-(6-фтор-1-метил-3-нитро-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат

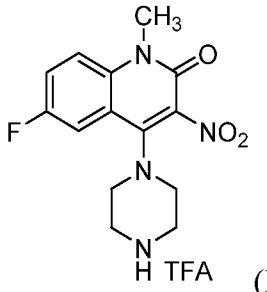


(I-4)

К раствору 4-хлор-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она (600 мг, 2,338 ммоль) в DMFA (8 мл) добавляли трет-бутилпиперазин-1-карбоксилат (435 мг, 2,338 ммоль) и триэтиламин (0,978 мл, 7,01 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакцию гасили водой. Желтое твердое вещество собирали в виде продукта трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-3-нитро-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата (765 мг, 1882 ммоль, выход 81%). ЖХ/МС Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 3,0 мин, 407,1 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,79-7,63 (м, 3H), 3,65 (с, 3H), 3,58 (уш.с, 4H), 3,07 (уш.с, 4H), 1,43 (с, 9H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 5

6-фтор-1-метил-3-нитро-4-(пиперазин-1-ил)хинолин-2(1H)-он, TFA

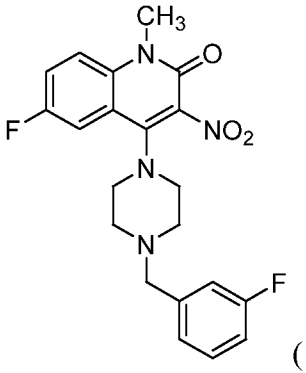


(I-5)

К раствору трет-бутил 4-(6-фтор-1-метил-3-нитро-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата (2,1 г, 5,17 ммоль) в CH_2Cl_2 добавляли (10 мл), TFA (5 мл, 64,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали и добавляли этилацетат. Желтое твердое вещество получали как продукт 6-фтор-1-метил-3-нитро-4-(пиперазин-1-ил)хинолин-2(1H)-он, TFA (1,72 г, 4,09 ммоль, выход 79%). Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 10:90 метанол:вода с 0,1% TFA; Подвижная фаза B: 90:10 метанол:вода с 0,1% TFA; Градиент: 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 1,62 мин, 307,2 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,73–7,67 (м, 2H), 7,64 (д, J = 10,0 Гц, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,11–3,03 (м, 4H), 2,93 (уш.с., 4H).

ПРИМЕР 1

6-фтор-4-{4-[(3-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он



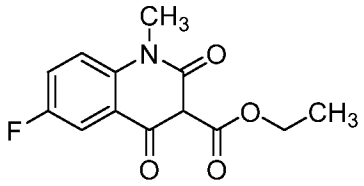
(1)

Готовили раствор 6-фтор-1-метил-3-нитро-4-(пиперазин-1-ил)хинолин-2(1H)-она, TFA (340 мг, 816 мкмоль) и DIPEA (646 мл, 3,6 ммоль) в DMFA (17,0 мл).

К 3-фторбензилбромиду, взвешенному в сосуде 16 x 100 мм с резьбой, добавляли 500 мкл 6-фтор-1-метил-3-нитро-4-(пиперазин-1-ил)хинолин-2(1H)-она, раствор TFA/DIPEA. Сосуд закрывали крышкой и оставляли встряхиваться при комнатной температуре до тех пор, пока реакция не завершится, как было измерено анализом ЖХ-МС (приблизительно 24 часа). Аликвоту DMFA объемом 500 мкл добавляли в сосуд и неочищенный материал очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 45-85% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Условия ЖХ\МС Колонка: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 10:90 метанол:вода с 0,1% TFA; Подвижная фаза B: 90:10 метанол:вода с 0,1% TFA; Градиент: 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Наблюдаемый MS Ion 415.1, время удерживания 1,23 минуты.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 6

Этил-6-фтор-1-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохинолин-3-карбоксилат



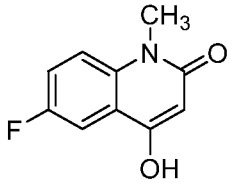
(I-6)

К раствору диэтилмалоната (0,903 г, 5,64 ммоль) в NMP (10 мл) в круглодонной колбе при 0 °C порциями добавляли 60%-ную дисперсию гидрида натрия (0,246 г, 6,15 ммоль) в минеральном масле. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут при 0°C, затем 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 6-фтор-1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (1 г, 5,12 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 120 °C в течение 2 часов. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакцию гасили ледяной водой и подкисляли 1 н. раствором HCl. Добавляли этиловый эфир и собирали твердое вещество бежевого цвета в виде продукта этил 6-фтор-1-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохинолин-3-

карбоксилата (245 мг, 0,924 ммоль, выход 18,03%). Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм. Время удерживания 1660 мин, 264,1 ($M-H^-$). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,77 (дд, J = 9,3, 2,9 Гц, 1H), 7,68-7,54 (м, 2H), 4,32 (к, J = 7,1 Гц, 2H), 3,56 (кв. с, 3H), 1,30 (т, J = 7,1 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 7

6-фтор-4-гидрокси-1-метилхинолин-2(1H)-он

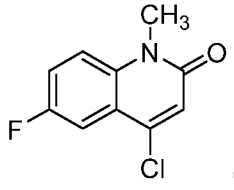


(I-7)

Суспензию этил-6-фтор-4-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилата (6,5 г, 24,51 ммоль) в 2 М растворе гидроксида натрия (150 мл, 300 ммоль) нагревали до 100°C в течение 12 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и при перемешивании по каплям добавляли 50 мл 6 н. HCl. Приблизительно через 30 мин твердые вещества собирали фильтрованием. Фильтр промывали водой и затем сушили в вакууме в течение ночи. Твердое вещество дополнительно сушили суспендированием в толуоле и выпариванием досуха (2x), получая продукт в виде не совсем белого твердого вещества (4,93 г, 24,51 ммоль, выход 100%). m/z; 194 $(M+H)^+$.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 8

4-хлор-6-фтор-1-метилхинолин-2(1H)-он



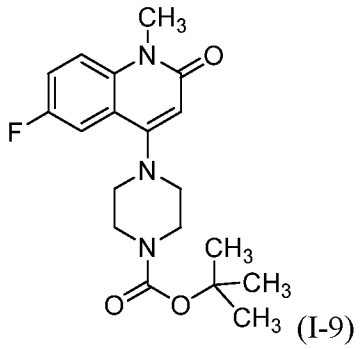
(I-8)

В высушенный сосуд, снабженный магнитной мешалкой, добавляли 6-фтор-

1-метилхинолин-2,4(1H,3H)-дион (1000 мг, 5,18 ммоль) и затем добавляли оксихлорид фосфора (5790 мкл, 62,1 ммоль). Смесь выдерживали в атмосфере азота и помещали на масляную баню при 100°C на 1 час. Реакционную смесь удаляли с масляной бани и охлаждали до комнатной температуры перед выпариванием в вакууме. Остаток растворяли/суспендировали в ацетонитриле и помещали на баню со льдом. Добавляли кристаллы льда и реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали в вакууме для удаления ацетонитрила. Полученную суспензию фильтровали и продукт собирали фильтрованием. Желтовато-коричневое твердое вещество сушили в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества красновато-коричневого цвета (974 мг). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,82-7,58 (м, 3H), 7,05 (с, 1H), 3,64 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 9

трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат



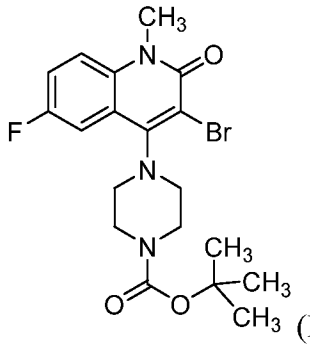
(I-9)

4-Хлор-6-фтор-1-метилхинолин-2(1H)-он (940 мг, 4,44 ммоль) и трет-бутилпиперазин-1-карбоксилат (910 мг, 4,89 ммоль) растворяли в смеси DMA (20 мл) и t-BuOH (5,00 мл). К карбонату цезия (4342 мг, 13,33 ммоль) добавляли (2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропокси-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(ii) метансульфонат (186 мг, 0,222 ммоль). Реакционную смесь дегазировали, затем продували азотом и затем нагревали при 85°C в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли 0,1 М раствором EDTA и добавляли EtOAc. Смесь фильтровали через целит для удаления коллоидного осажденного палладия. Затем отделяли органический слой и водную смесь повторно экстрагировали EtOAc (2x).

Объединенные экстракты промывали один раз соляным раствором, затем сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением сырого продукта в виде вязкого масла темно-фиолетового цвета. Остаток растворяли в DCM и адсорбировали на силикагеле, затем материал фракционировали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя 90-100% EtOAc в гексанах. Гомогенные фракции объединяли, получая продукт в виде бесцветного масла, 960 мг. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,63-7,44 (м, 3H), 6,13 (с, 1H), 3,57 (с, 7H), 2,99 (шир. т, J=4,6 Гц, 4H), 1,44 (с, 9H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 10

трет-бутил 4-(3-бром-6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат



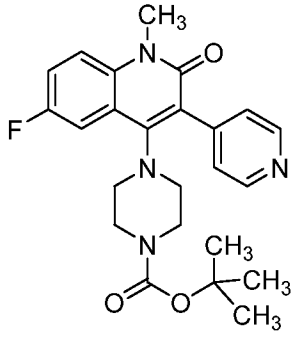
(I-10)

Трет-бутил 4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат (98 мг, 0,271 ммоль) растворяли в DMF (2 мл) в круглодонной колбе, выдерживаемой в атмосфере азота. Раствор охлаждали до 0°C и добавляли N-бромсукцинимид (43,9 мг, 0,247 ммоль) одной порцией. Затем растворитель удаляли в высоком вакууме и полученный остаток растворяли в DCM, адсорбировали на SiO_2 и затем хроматографировали с использованием 40% EtOAc в гексанах. Гомогенные фракции объединяли и упаривали в вакууме с получением продукта в виде бесцветной пленки (98 мг, выход 88%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,80-7,73 (м, 1H), 7,39-7,30 (м, 2H), 3,78 (с, 3H), 1,51 (с, 9H). Сигнал DCM наблюдали при 5,3 м.д.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 11

трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-4-

ил)пиперазин-1-карбоксилат

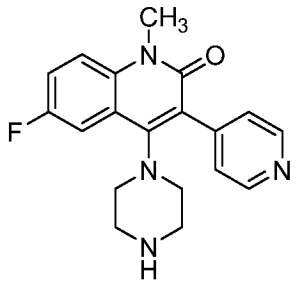


(I-11)

Трет-бутил-4-(3-бром-6-фтор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат (562 мг, 1,276 ммоль) и 4-(трибутилстаннил)пиридин (0,392 мл, 1,276 ммоль) растворяли в безводном DMFA (10 мл). Реакционную колбу вакуумировали и трижды продували азотом. Затем добавляли тетракис (147 мг, 0,128 ммоль) и процедуру вакуумирования/промывки повторяли дважды. Реакционную смесь нагревали при 100°C в атмосфере азота в закрытой пробирке в течение 48 часов. Затем реакционную смесь фракционировали с помощью флэш-хроматографии с использованием 5% MeOH в DCM. Гомогенные фракции объединяли и упаривали в вакууме с получением продукта в виде масла желтого цвета, 928 мг.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 12

6-фтор-1-метил-4-(пиперазин-1-ил)-3-(пиридин-4-ил)хинолин-2(1H)-он



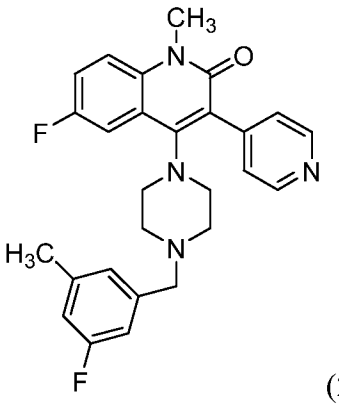
(I-12)

Трифторуксусную кислоту (8,15 мл, 106 ммоль) добавили к раствору трет-бутил-4-(6-фтор-1-метил-2-оксо-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата (928 мг, 2,116 ммоль) в DCM (8 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смесь разбавляли водой и сильнокислый водный слой отделяли от раствора в дихлорметане. Органический слой повторно экстрагировали дополнительным количеством воды (водный экстракт оставался сильнокислым). Объединенные

водные экстракты объединяли и затем подщелачивали (pH~14) добавлением твердого KOH. Полученную смесь экстрагировали, используя DCM (3x), и объединенные экстракты сушили над $MgSO_4$, фильтровали и выпаривали в вакууме с получением масла, которое затвердевало при стоянии в течение ночи (243 мг).

ПРИМЕР 2

6-фтор-4-{4-[(3-фтор-5-метилфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-2-он



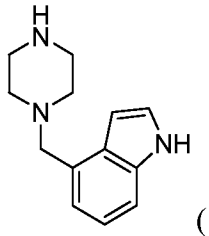
(2)

К раствору 6-фтор-1-метил-4-(пиперазин-1-ил)-3-(пиридин-4-ил)хинолин-2(1H)-она (22 мг, 0,065 ммоль) в DMFA (1,5 мл) добавляли 4-формил-3-гидроксибензонитрил (14,35 мг, 0,098 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего добавляли цианоборгидрид натрия (8,18 мг, 0,130 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Продукт реакции очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 35-75% B в течение 20 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Выход продукта составил 13,5 мг, и его чистота, оцененная по анализу ЖХ-МС, составила 100%. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую ЖХ/МС. Условия ввода 1: Колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1%

трифторуксусной кислоты; температура: 50 °C; Градиент: от 0% B до 100% B в течение 3 мин, затем 0,75 мин выдержки при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты ввода 1: Чистота: 100,0%; Наблюдаемая масса: 461,22; Время удерживания: 1,48 мин Условия ввода 2: Колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы размером 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: от 0% B до 100% B в течение 3 мин, затем 0,75 мин выдержки при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты ввода 2: Чистота: 100,0%; Наблюдаемая масса: 461,2; Время удерживания: 2,26 мин. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 8,74 (д, J=6,6 Гц, 2H), 7,79 (д, J=6,6 Гц, 2H), 7,70-7,63 (м, 2H), 7,62-7,53 (м, 1H), 7,00-6,92 (м, 1H), 6,89 (шир. д, J=8,8 Гц, 2H), 3,63 (с, 3H), 3,49 (с, 2H), 2,82 (уш.с, 4H), 2,50-2,44 (м, 4H), 2,31 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 13

4-(пиперазин-1-илметил)-1H-индол, 2 TFA



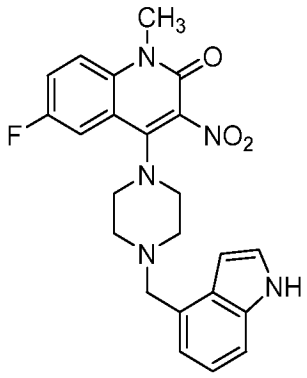
(13)

К раствору трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (481 мг, 2,58 ммоль) в DMFA (1,5 мл) добавляли 1H-индол-4-карбальдегид (250 мг, 1,722 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем добавляли цианборгидрид натрия (325 мг, 5,17 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 дней. Затем реакционную смесь добавляли к метанолу, фильтровали и фильтрат очищали с помощью праперативной ВЭЖХ с использованием буферной системы CH_3CN-H_2O-TFA. Фракции собирали и концентрировали в скоростном вакууме в течение ночи. ЖХ/МС показала, что большая часть материала не содержала boc-группы. Материал растворяли в дихлорметане (5 мл) и добавляли 1 мл TFA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов и концентрировали с

получением 4-(пиперазин-1-илметил)-1H-индола, 2 TFA (420 мг, 0,947 ммоль, выход 55,0%) в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС Колонка: Phenomenex LUNA C18, 2,0×50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 1,577 мин, 216,1 (MH^+).

ПРИМЕР 3

4-(4-((1H-индол-4-ил)метил)пиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он



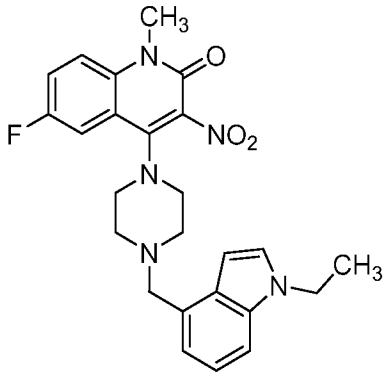
(3)

К раствору 4-хлор-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она (150 мг, 0,585 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли 4-(пиперазин-1-илметил)-1H-индол, 2 TFA (285 мг, 0,643 ммоль) и триэтиламин (0,326 мл, 2,338 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение выходных. ЖХ/МС показала завершение реакции. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием буферной системы CH_3CN-H_2O-TFA. Фракции собирали и концентрировали в скоростном вакууме в течение ночи. Продукт снова очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием буферной системы CH_3CN-H_2O-ацетат аммония. Фракции собирали и концентрировали в скоростном вакууме в течение ночи. В качестве конечного продукта получали желтое твердое вещество 4-(4-((1H-индол-4-ил)метил)пиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он (180 мг, 0,413 ммоль, выход 70,7%). Колонка для ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ

ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм. Время удерживания 3,1 мин, 436,1 (MH^+).

ПРИМЕР 4

4-{4-[(1-этил-1H-индол-4-ил)метил]пиперазин-1-ил}-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он



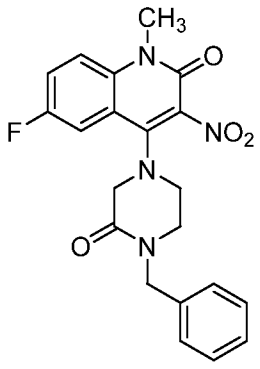
(4)

К раствору 4-(4-((1H-индол-4-ил)метил)пиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она (15 мг, 0,034 ммоль) в DMFA (1,5 мл), добавляли 60%-ную дисперсию гидрида натрия (2,76 мг, 0,069 ммоль) в минеральном масле. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем добавляли иодэтан (10,75 мг, 0,069 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакцию гасили метанолом. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 20-100% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Колонка условий ЖХ\МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм: наблюдаемый МС-ион 464,1, время

удерживания 2,28 минуты. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 7,80-7,65 (м, 2H), 7,63-7,49 (м, 1H), 7,45-7,32 (м, 2H), 7,17-7,06 (м, 1H), 7,03 - 6,94 (м, 1H), 6,73-6,51 (м, 1H), 4,20 (к, *J* =9,3 Гц, 2H), 3,83 (с, 2H), 3,64 (с, 3H), 3,16-3,09 (м, 4H), 2,71-2,59 (м, 4H), 1,37 (т, *J* =9,3 Гц, 3H).

ПРИМЕР 5

4-(4-бензил-3-оксопиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он



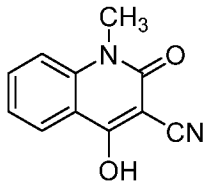
(5)

4-Хлор-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он (25 мг, 0,097 ммоль), 1-бензилпиперазин-2-он (20,39 мг, 0,107 ммоль) и основание Хюнига (0,037 мл, 0,214 ммоль) растворяли в DMF (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Продукт, содержащий раствор, фракционировали с использованием препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19 ×200 мм, частицы 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 21-61% B в течение 20 минут, затем 4-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Выход продукта составил 24,1 мг, и его чистота, оцененная по анализу ЖХ-МС, составила 100%. Для определения конечной чистоты использовали аналитическую ЖХ/МС. Условия ввода 1: Колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: от 0% B до 100% B в течение 3 мин, затем 0,75 мин выдержки при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты ввода 1: Чистота: 100,0%;

Наблюдаемая масса: 411,2; Время удерживания: 1,6 мин Условия ввода 2: Колонка: Waters XBridge C18, 2,1 мм x 50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; температура: 50 °C; Градиент: от 0% B до 100% B в течение 3 мин, затем 0,75 мин выдержки при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: МС и УФ (220 нм). Результаты ввода 2: Чистота: 100,0%; Наблюдаемая масса: 411,02; Время удерживания: 1,6 мин. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 7,77–7,61 (м, 3H), 7,43–7,36 (м, 2H), 7,35–7,27 (м, 3H), 4,62 (с, 2H)), 3,88 (с, 2H), 3,66 (с, 3H), 2,56 (с, 4H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 14

4-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил



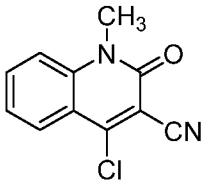
(I-14)

В круглодонной колбе растворяли метил-2-цианоацетат (4,95 г, 50 ммоль) в NMP (40 мл) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли гидрид натрия (1,818 г, 50,0 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут при 0°C и затем 15 минут при комнатной температуре. При комнатной температуре добавляли 1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (8,86 г, 50,0 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 2 часов. Анализ ЖХ-МС показал, что реакция завершилась. Реакционную смесь разбавляли 60 мл диэтилового эфира и смесь выливали на 50 мл льда и 100 мл 1 н HCl. Образовавшиеся твердые вещества собирали (6 г). По мере выпаривания эфира в фильтрате образовывались дополнительные твердые вещества, и данные твердые вещества собирали отдельно (2,2 г). ЯМР и ЖХ-МС обоих твердых образцов были идентичными и согласовывались с продуктом. ЖХ/МС 2,15 мин, M^{+1}: 201,2, точная масса: 200,1. Начальный % B = 0, конечный % B = 100, время градиента = 4 минуты, скорость потока = 0,8 мл/мин, длина волны = 220 нм, пара растворителей = вода-метанол-0,1% TFA, растворитель A = 90% вода-10% метанол-0,1% TFA, растворитель B = 10% вода-90% метанол-0,1% TFA, колонка = Phenomenex-Luna 2,0×50 мм 3 мкм ^{1}H ЯМР

(400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,11 (дд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,77 (ддд, J=8,6, 7,2, 1,6 Гц, 1H), 7,56 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,34 (т, J=7,6 Гц, 1H), 3,57 (с, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 15

4-хлор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил

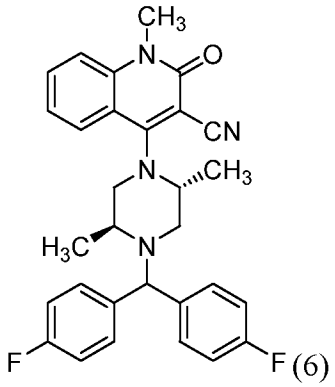


(I-15)

В круглодонной колбе при комнатной температуре объединяли 1-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохинолин-3-карбонитрил (6 г, 30,0 ммоль) и оксихлорид фосфора (13,97 мл, 150 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 110 °C в течение 40 минут. После охлаждения до комнатной температуры летучие вещества удаляли на ротационном испарителе. К неочищенному материалу добавляли 50 мл диэтилового эфира и летучие вещества снова удаляли на ротационном испарителе. Медленно добавляли воду при интенсивном перемешивании и твердые вещества собирали фильтрованием. Остаток помещали в вакуум в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (4,6 г) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 8,14 (дд, J=8,2, 1,3 Гц, 1H), 7,82 (ддд, J=8,6, 7,1, 1,5 Гц, 1H), 7,51-7,42 (м, 2H), 3,79 (с, 3H).

ПРИМЕР 6

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил (гомохиральный)



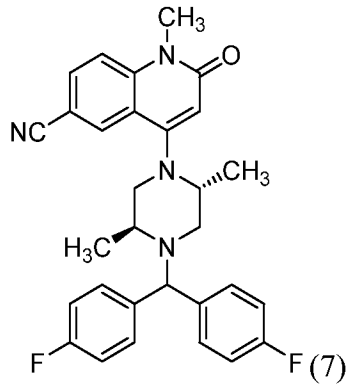
(6)

Во флакон для микроволновой печи помещали 4-хлор-1-метил-2-оксо-1,2-

дигидрохинолин-3-карбонитрил (25 мг, 0,114 ммоль), (2R,5S)-1-(бис(4-фторфенил) метил)-2,5-диметилпиперазин (36,2 мг, 0,114 ммоль) и основание Хюнига (0,040 мл, 0,229 ммоль). Смесь растворяли в NMP (2 мл). Реакционную смесь нагревали при 150°C в течение 14 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Смесь фильтровали через фритту 4 мкм, концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ: Колонка: XBridge C18, 200 мм × 19 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 0-минутная выдержка при 41% B, 41–81% B в течение 22 минут, затем 6-минутная выдержка при 100% B; Скорость потока: 20 мл/мин; Температура колонки: 25°C. Сбор фракций запускали сигналами МС и УФ. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Условия ЖХ\МС QC-ACN-AA-XB: ЖХ-МС: *m/z* = 499,2 (M+H); время удерживания 2,58 минуты.

ПРИМЕР 7

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-карбонитрил (гомохиральный)



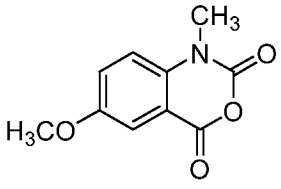
(7)

К перемешиваемому раствору 4-((2S,5R)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-карбонитрила (0,08 г, 0,270 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (0,141 мл, 0,810 ммоль) и 4,4'-(бромметилен)бис(фторбензол) (0,115 г, 0,405 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (100 мл). Органический слой промывали соляным раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с

получением неочищенного продукта. который очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой. Способ: Колонка: Waters XBridge C18, 150 мм x 19 мм, частицы 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 0-минутная выдержка при 15% B, 15-65% B в течение 25 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Скорость потока: 15 мл/мин. Фракцию концентрировали при пониженном давлении для очистки 4-((2S,5R)-4-(бис(4-фторфенил)метил)-2,5-диметилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1.,2-дигидрохинолин-6-карбонитрила (50 мг, 0,100 ммоль, выход 37,2%). ЖХ- МС: *m/z* = 499,2 (M+H); rt 2,426 мин. Колонка для способа ЖХ-МС: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1) мм, подвижная фаза 2,5 мкм A: 95% вода: 5% ацетонитрил; 10 мМ NH_4OAC, подвижная фаза B: 5% вода:95% ацетонитрил; 10 мМ NH_4OAC Поток: 1,1 мл/мин, температура: 50 °C, ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ м.д. 8,12 (д, *J* = 1,71 Гц, 1 H) 7,97 (дд, *J* = 8,80, 1,71 Гц, 1H) 7,66 (д, *J* = 8,80 Гц, 1H) 7,51–7,62 (м, 4H) 7,15 (дт, *J* = 17,61, 8,80 Гц, 4H) 6,06 (с, 1H) 4,82 (с, 1H) 3,75–3,83 (м, 1H) 3,55–3,65 (м, 1H) 3,33 (с, 3H) 3,01–3,11 (м, 2H) 2,65 (дд, *J* = 11,86, 2,57 Гц, 1H) 2,27 (дд, *J* = 11,49, 1,96 Гц, 1H) 1,09 (д, *J* = 6,60 Гц, 3H) 1,04 (д, *J* = 6,36 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 16

6-метокси-1-метил-2H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4(1H)-дион



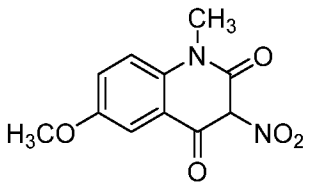
(I-16)

К раствору 6-метокси-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-диона (3 г, 15,53 ммоль) в DMFA (20 мл) добавляли порциями 60%-ную дисперсию гидрида натрия (0,745 г, 18,64 ммоль) в минеральном масле при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин, после чего по каплям добавляли йодистый метил (1,165 мл, 18,64 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили водой. К смеси добавляли диэтиловый эфир. Продукт, 6-метокси-1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (3,11 г, 15,01 ммоль, выход 97%), собирали в виде

твердого вещества бежевого цвета. МС-колонка: Phenomenex LUNA C18, 2,0×50 мм, частицы размером 3 мм; 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: 40 °С; Градиент: 0% В, 0-100% В в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% В; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 2,032 мин, 208,0 ($M+H^+$). ^{1}Н ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,68-7,23 (м, 3Н), 3,85 (с, 3Н), 3,46 (с, 3Н).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 17

6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1Н,3Н)-дион

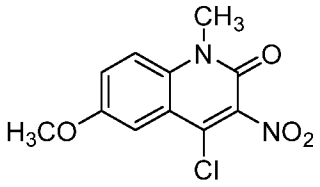


(I-17)

К раствору этилового эфира 2-нитроацетата (2,120 г, 15,93 ммоль) в NMP (10 мл) в круглодонной колбе при 0 °С добавляли порциями 60%-ную дисперсию гидрида натрия (0,695 г, 17,38 ммоль) в минеральном масле. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут при 0°С, затем 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 6-метокси-1-метил-1Н-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (3 г, 14,48 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 120°С в течение 3 часов. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакцию гасили ледяной водой. Смесь подкисляли 1 н. раствором HCl. Добавляли этиловый эфир и получали 6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1Н,3Н)-дион (1,66 г, 6,63 ммоль, выход 45,8%) в виде желтого твердого вещества. Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA. C18, 2,0 X 50 мм, частицы размером 3 мм; 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: 40 °С; Градиент: 0% В, 0-100% В в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% В; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 1,613 мин, 251,1 ($M+H^+$). ^{1}Н ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,61 (д, J = 2,7 Гц, 1Н), 7,54 (д, J = 9,3 Гц, 1Н), 7,39 (дд, J = 9,2, 2,8 Гц, 1Н), 3,85 (с, 3Н), 3,59 (с, 3Н).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 18

4-хлор-6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он

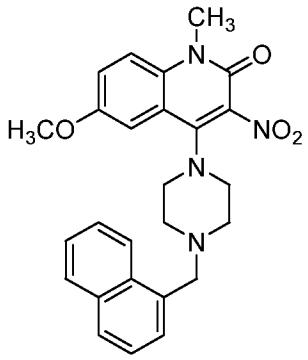


(I-18)

В запаянную пробирку добавляли 6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2,4(1H,3H)-дион (1,65 г, 6,59 ммоль) и оксихлорид фосфора (10 мл, 107 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 95°C в течение 4 ч. Затем реакционную смесь концентрировали, остаток выливали в воду со льдом и нейтрализовали твердым раствором $NaHCO_3$. Смесь экстрагировали дихлорметаном (2×40 мл) и органическим раствором. слои объединяли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали с получением 4-хлор-6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она (1,58 г, 5,88 ммоль, выход 89%) в виде оранжевого твердого вещества. Колонка для ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0 x 50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 2,703 мин, 269,1 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 7,76 (д, J = 9,2 Гц, 1H), 7,57 (д, J = 9,5 Гц, 1H), 7,47 (с, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,72 (с, 3H).

ПРИМЕР 8

6-метокси-1-метил-4-{4-[(нафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он



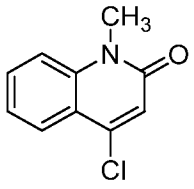
(8)

К раствору 4-хлор-6-метокси-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-она (15 мг,

0,056 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли 1-(нафталин-1-илметил)пиперазин. Добавляли (12,64 мг, 0,056 ммоль) и триэтиламин (0,023 мл, 0,168 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ/МС показала завершение реакции. Затем к реакционной смеси добавляли CH_3CN. Реакционную смесь очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 50-90% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. ЖХ\МС: Колонка: Phenomenex LUNA C18, 2,0×50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 40 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на уровне 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Наблюдаемый MS Ion 459,2, время удерживания 2,34 минуты. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 8,31 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7,95–7,89 (м, 1H), 7,88–7,83 (м, 1H), 7,61–7,37 (м, 6H)), 7,36-7,31 (м, 1H), 4,00 (с, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,60 (с, 3H), 3,13 (шир., с, 4H), 2,69 (шир., с, 4H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 19

4-хлор-1-метилхинолин-2(1H)-он



(I-19)

При комнатной температуре 4-гидрокси-1-метилхинолин-2(1H)-он (1,4 г, 7,99 ммоль) и оксихлорид фосфора (7,45 мл, 80 ммоль) смешивали в круглодонной колбе на 100 мл, снабженной мешалкой и обратным конденсатором. Круглодонную колбу помещали на масляную баню при 95°C. Через 2,5 часа реакционной смеси давали остыть до комнатной температуры. Реакционную смесь медленно добавляли к 300 мл воды со льдом. Суспензию экстрагировали 200 мл дихлорметана и отбрасывали, так как после ротационного выпаривания оставалось очень мало массы. Водную

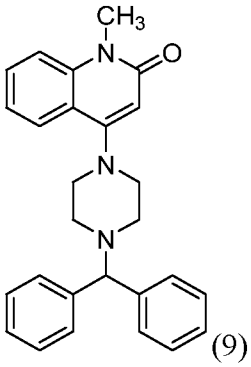
часть медленно добавляли к избытку твердого бикарбоната натрия. Добавляли дихлорметан (300 мл) и остаточные твердые вещества удаляли фильтрованием. Органическую часть сушили над сульфатом магния. Растворитель удаляли на роторном испарителе с получением твердого вещества оранжевого цвета (1,1 г).

Исходный материал: ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,30 (с, 1H), 7,90 (дд, J=7,8, 1,5 Гц, 1H), 7,68-7,59 (м, 1H), 7,48 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,25 (т, J=7,6 Гц, 1H), 5,88 (с, 1H), 3,54 (с, 3H).

Продукт: ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,98 (дд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,81-7,72 (м, 1H), 7,65 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,46-7,37 (м, 1H), 6,96 (с, 1H), 3,64 (с, 3H). ЖХ/МС 2,32 мин, M+1: 194,0, точная масса: 193,03, начальный % B = 0, конечный % B = 100, время градиента = 4 мин, скорость потока = 0,8 мл/мин, длина волны = 220, пара растворителей = ACN: Вода: ацетат аммония, Растворитель A = 5% ACN: 95% Вода: 10 мМ ацетат аммония, Растворитель B = 95% ACN: 5% Вода: 10 мМ ацетат аммония, Колонка = Phenomenex LUNA C18, 30 x 2, 3 мкм, температура печи = 40 ° C, ЖХ/МС 3,02 мин, M+1: 194,1, точная масса: 193,03, начальный % B = 0, конечный % B = 100, время градиента = 4 мин, скорость потока = 0,8 мл/мин, длина волны = 220 нм, пара растворителей = вода-метанол-0,1% TFA, растворитель A = 90% вода-10% метанол-0,1% TFA, растворитель B = 10% вода-90% метанол-0,1% TFA, Колонка = Phenomenex-Luna 2,0 X 50 мм 3 мкм .

ПРИМЕР 9

4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метилхинолин-2(1H)-он



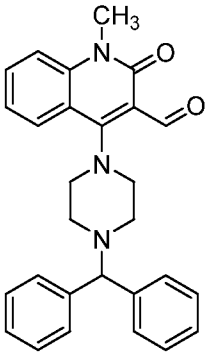
(9)

В микроволновом реакционном сосуде 1-бензгидрилпиперазин (0,555 г, 2,200 ммоль) и 4-хлор-1-метилхинолин-2(1H)-он (0,387 г, 2 ммоль) растворяли в NMP (8 мл). Реакционный сосуд запаивали в атмосфере аргона и нагревали при 200°C в

течение 30 минут. Неочищенную реакционную смесь подвергали прямой хроматографии с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Начальный % B = 30 до конечного% B = 80, время градиента = 10 минут, скорость потока = 35 мл/мин, длина волны = 220 нм, растворитель A = 10% метанол, 90% вода с 0,1% TFA, растворитель B = 90% метанола, 10% воды с 0,1% TFA, колонка = Phenomenex-Luna 30 X 50 мм S10. Продукт получали в виде белого твердого вещества (250 мг). ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d) δ 7,74 (д, J =7,7 Гц, 1H), 7,62-7,55 (м, 1H), 7,53-7,45 (м, 5H), 7,33 (т, J=7,5 Гц, 4H), 7,22 (к, J=6,8 Гц, 3H), 6,01 (с, 1H), 4,42 (с, 1H), 3,55 (с, 3H), 3,40 (д, J=3,7 Гц, 2H), 3,09 (уш.с., 3H), 2,56 (уш.с., 3H).

ПРИМЕР 10

4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегид

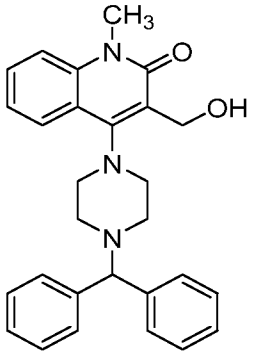


(10)

DMFA (1 мл) охлаждали в ледяной воде и добавляли оксихлорид фосфора (140 мкл, 1500 ммоль). После перемешивания в течение 10 минут добавляли 4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метилхинолин-2(1H)-он (205 мг, 0,5 ммоль) в 1 мл DMFA и реакционную смесь перемешивали до комнатной температуры. . Через 20 минут анализ ЖХ\МС показал массу продукта и отсутствие массы исходного материала. Добавляли избыток льда и реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока лед не растаял. pH доводили до 10 с помощью 1 н. водного раствора NaOH. Желтый осадок (108 мг) собирали с помощью воронки Бюхнера и сушили в вакууме в течение ночи. Протонный ЯМР соответствовал желаемому альдегиду. ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 10,44 (с, 1H), 8,16–7,89 (м, 5H), 7,39 (уш.с, 10H), 5,22–5,03 (м, 1H), 4,64–4,29 (м, 2H), 3,66-3,35 (м, 5H).

ПРИМЕР 11

4-[4-(дифенилметил)пиперазин-1-ил]-3-(гидроксиметил)-1-метил-1,2-дигидрохинолин-2-он



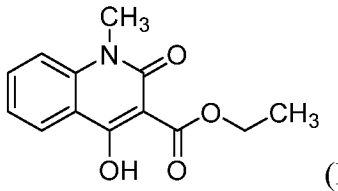
(11)

В реакционном сосуде боргидрид натрия (0,011 г, 0,300 ммоль) и 4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегид (0,044 г, 0,1 ммоль)) объединяли в метаноле (0,500 мл). Наблюдали выделение газа, и раствор из желтого стал бесцветным. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 45-85% B в течение 20 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Выход продукта составил 6,3 мг, и его чистота, оцененная по анализу ЖХ-МС, составила 100%. Для определения окончательной чистоты использовали два аналитических ввода ЖХ/МС. Условия ввода 1: Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1×50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,75-минутная выдержка при 100% B; Поток: 1,0 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм ЖХ/МС: 2,2 минуты, M+1=440,1. Условия ввода 2: Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1×50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; температура: 50 °C; Градиент: 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,75-минутная выдержка при 100% B; Поток: 1,0 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм ЖХ\МС: 1,4 минуты, M+1=440,3.

Протонный ЯМР был получен в дейтерированном DMSO с подавлением сигнала воды. Пиперазиновые атомы водорода не наблюдались и интегральный пик метила был низким, что согласуется с подавлением сигнала воды. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 7,96 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 7,60–7,54 (м, 1H), 7,53–7,47 (м, 5H), 7,33 (т, J = 7,5 Гц, 4H), 7,26 (т, J = 7,7 Гц, 1H), 7,23–7,18 (м, 2H), 4,78–4,71 (м, 1H), 4,61 (д, J = 5,1 Гц, 2H), 4,43 (с, 1H), 3,61 (с, 2H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 20

Этил-4-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат

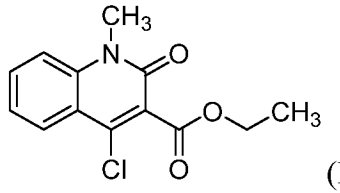


(I-20)

В круглодонной колбе диэтилмалонат (6,8 г, 42,5 ммоль) растворяли в NMP (40 мл) и охлаждали до 0°C. Добавляли гидрид натрия (1,08 г, 29,7 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 5 минут при 0°C, затем 15 минут при комнатной температуре. При комнатной температуре добавляли 1-метил-1H-бензо[d][1,3]оксазин-2,4-дион (5,1 г, 28,8 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 3 часов. Добавляли диэтиловый эфир (60 мл) и твердые вещества собирали на фильтре. Твердые вещества промывали дополнительными 30 мл диэтилового эфира. Твердые вещества ресуспендировали в 25 мл метанола и 50 мл воды. Добавляли соляную кислоту (6 мл, 5M водный раствор) и смесь трижды экстрагировали этилацетатом порциями по 80 мл. Объединенные органические слои экстрагировали 1×20 мл насыщенного солевого раствора. Органическую часть сушили над сульфатом магния. Растворитель удаляли на роторном испарителе с получением указанного в заголовке соединения (5,3 г, 51%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 14,23 (с, 1H), 8,21 (дд, J=8,0, 1,5 Гц, 1H), 7,74-7,65 (м, 1H), 7,33 (д, J=8,5 Гц, 1H), 7,30-7,25 (м, 1H), 4,52 (к, J=7,2 Гц, 2H), 3,67 (с, 3H), 1,50 (т, J=7,2 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 21

Этил-4-хлор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат

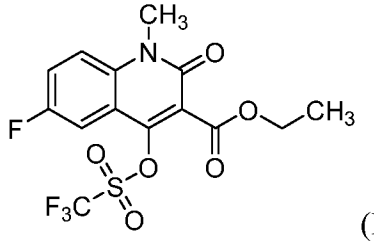


(I-21)

В круглодонную колбу добавляли этил 1-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохинолин-3-карбоксилат (5 г, 20,22 ммоль) и оксихлорид фосфора (5 мл, 53,6 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 40 минут. Летучие вещества удаляли на ротационном испарителе. К неочищенному остатку добавляли порциями 50 мл льда в течение 15 минут и затем 150 мл воды. Смесь перемешивали 15 минут и добавляли этилацетат. Органическую часть экстрагировали порциями по 20 мл 1x воды, 3x 1 н. водного гидроксида натрия, 1x воды и 1x насыщенного солевого раствора. Органическую часть сушили над сульфатом магния и растворитель удаляли на роторном испарителе. Остаток помещали в вакуум на ночь с получением 3,9 г бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,09 (дд, J=8,2, 1,1 Гц, 1H), 7,73-7,68 (м, 1H), 7,43 (д, J=8,5 Гц, 1H), 7,38 (т, J=7,7 Гц, 1H), 4,49 (к, J=7,0 Гц, 2H), 3,75 (с, 3H), 1,44 (т, J = 7,2 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 22

Этил-6-фтор-1-метил-2-оксо-4-(((трифторметил)сульфонил)окси)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат



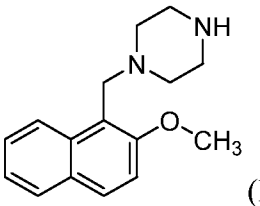
(I-22)

1,1,1-Трифтор-N-фенил-N-(трифторметил)сульфонилметансульфонамид (404 мг, 1,131 ммоль) добавляли к раствору этил-6-фтор-1-метил-2,4-диоксо-1,2 3,4-тетрагидрохинолин-3-карбоксилата (100 мг, 0,377 ммоль) и DIEA (0,263 мл, 1,508 ммоль) в THF (3 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение выходных. ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали. Неочищенный продукт очищали на колонке Biotage, используя в качестве элюента от гексана до 40% этилацетата в гексане.

Продукт выходил при ~30% этилацетата в гексане. Фракции собирали и концентрировали с получением этил-6-фтор-1-метил-2-оксо-4-(((трифторметил)сульфонил)окси)-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилата (71 мг, 0,179 ммоль, выход 47,4%) в виде светло-желтого твердого вещества Колонка ЖХ/МС: Phenomenex LUNA C18, 2,0×50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 10:90 метанол:вода с 0,1% TFA; Подвижная фаза B: 90:10 метанол:вода с 0,1% TFA; Градиент: 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм. Время удерживания 3,9 мин, 397,9 ($M+H^+$). ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,60 (дд, J = 8,3, 2,7 Гц, 1H), 7,55-7,44 (м, 2H), 4,48 (к, J = 7,1 Гц, 2H), 3,78 (с, 3H), 1,44 (т, J = 7,2 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 23

1-((2-метоксинафталин-1-ил)метил)пиперазин



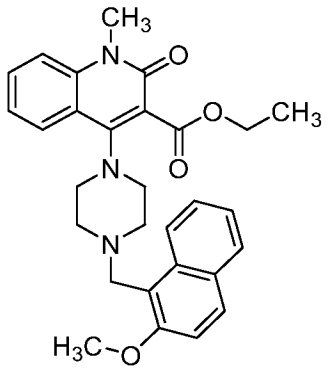
(I-23)

Раствор 1-BOC-пиперазина (2,8 г, 15,03 ммоль) и 2-метокси-1-нафтальдегида (2,80 г, 15,03 ммоль) в DMF (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли цианоборгидрид натрия (1,417 г, 22,55 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Анализ ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Растворитель удаляли и остаток очищали, используя 1:1 гексан/этилацетат на колонке с силикагелем 40 г. Фракции, содержащие трет-бутил-4-((2-метоксинафталин-1-ил)метил)пиперазин-1-карбоксилат, объединяли и растворитель удаляли с помощью роторного испарителя. Твердое вещество растворяли в дихлорметане (20 мл) и добавляли TFA (5 мл, 64,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа и удаляли растворитель с получением твердого вещества белого цвета (3,85 г). ЖХ-МС: Колонка: Phenomenex LUNA C18, 2,0×50 мм, частицы размером 3 мм; Подвижная фаза A: 10:90 метанол:вода с 0,1% TFA; Подвижная фаза B: 90:10 метанол:вода с 0,1% TFA; Градиент: 0-100% B в течение 4 минут, затем 1 минута выдержки на 100% B; Поток: 0,8 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Время удерживания 0,8 мин, M+1=

257,3.

ПРИМЕР 12

Этил-4-{4-[(2-метоксинафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат



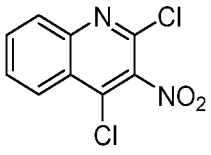
(12)

В микроволновом реакционном сосуде 1-((2-метоксинафталин-1-ил)метил)пиперазин (1,55 г, 6,05 ммоль), этил-4-хлор-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3- карбоксилат (1,607 г, 6,05 ммоль) и триэтиламин (0,843 мл, 6,05 ммоль) объединяли в DMFA (12 мл). Реакционную смесь нагревали в микроволновом реакторе при 100°C в течение 1 часа, затем оставляли при комнатной температуре в течение выходных. В течение выходных образовался кристаллический осадок, который по данным ЯМР соответствовал хлориду триэтиламмония. Жидкую часть выливали в 100 мл воды и собирали выпавшие в осадок твердые вещества. ЯМР и ЖХМС твердых веществ после сушки показали, что продукт загрязнен следами исходных материалов и DMFA. ^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,27 (д, J = 8,6 Гц, 1H), 8,01 (дд, J = 8,1, 1,5 Гц, 1H), 7,82 (дд, J = 11,4, 8,7 Гц, 2H)), 7,64-7,48 (м, 2H), 7,47-7,23 (м, 5H, перекрытие $CHCl_3$), 4,39 (к, J = 7,2 Гц, 2H), 4,09 (с, 2H), 4,00 (с, 3H), 3,67 (с, 3H), 3,22 (шир. т, J = 4,5 Гц, 4H), 2,77 (уш.с, 3H), 1,38 (т, J = 7,1 Гц, 3H). Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 50-90% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Выход продукта составил 22,3 мг, и его чистота, оцененная по анализу ЖХ-МС, составила

100%. Для определения окончательной чистоты использовали два аналитических ввода ЖХ/МС. Условия ввода 1: Колонка: Waters BEH C18, 2,0×50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм ЖХ-МС: 2,07 минуты, M+1=486,23, M-1=484,23. Условия ввода 2: Колонка: Waters BEH C18, 2,0 x 50 мм, частицы размером 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 0,5 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм ЖХ-МС: 3,22 минуты, M+1=486,23, M-1=484,23. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 8,19 (д, *J* = 8,8 Гц, 1H), 7,99–7,89 (м, 2H), 7,85 (д, *J* = 8,1 Гц, 1H), 7,73–7,61 (д, J = 8,8 Гц, 1H), м, 1H), 7,57-7,49 (м, 2H), 7,46 (д, *J* = 9,2 Гц, 1H), 7,36 (к, *J* = 7,8 Гц, 2H), 4,22 (к, *J* = 7,0 Гц, 2H), 4,01 (с, 2H), 3,94 (с, 3H), 3,56 (с, 3H), 3,03 (уш.с, 4H), 2,69 (уш.с, 4H), 1,23 (т, *J* = 7,0 Гц, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 24

2,4-дихлор-3-нитрохинолин

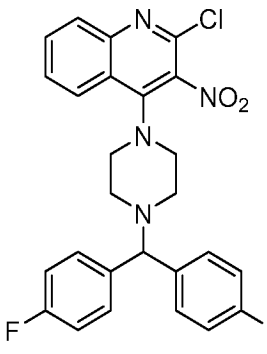


(I-24)

В круглодонную колбу на 100 мл добавляли 3-нитрохинолин-2,4-диол (2 г, 9,70 ммоль) и фосфорилтрихлорид (9,04 мл, 97 ммоль). К данной желтой взвеси добавляли N,N-диметиланилин (2,485 мл, 19,40 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 1,5 часов. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали. Коричневый остаток помещали в толуол (10 мл) и концентрировали для удаления любого непрореагировавшего $POCl_3$. Остаток обрабатывали льдом (25 г) в течение 20 мин и осторожно нейтрализовали твердым Na_2CO_3. Смесь экстрагировали эфиром (3×20 мл). Объединенные органические слои сушили, получая продукт светло-коричневого цвета.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 25

4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-2-хлор-3-нитрохинолин



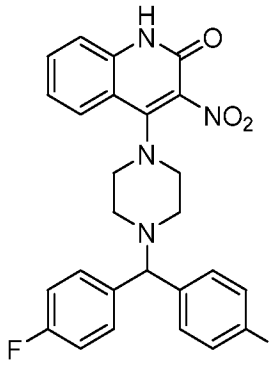
(I-25)

К раствору 2,4-дихлор-3-нитрохинолина (1 г, 4,11 ммоль) в DMFA (10 мл) добавляли 1-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин (1,186 г, 4,11 ммоль) и триэтиламин (1,147 мл, 8,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Анализ ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Смесь разбавляли этилацетатом, промывали водой, насыщенным солевым раствором и сушили. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (1:2 гексан:этилацетат; колонка 24 г). Собирали фракции с получением продукта в виде твердого вещества желтого цвета (2 г). Продукт (0,1 ммоль) дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 80-100% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Выход продукта составил 5,0 мг, и его чистота, оцененная по анализу ЖХ-МС, составила 100%. Для определения окончательной чистоты использовали два аналитических ввода ЖХ/МС. Условия введения 1: Колонка: Waters BEH C18, 2,0×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 1,0 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм. Условия ввода 2: Колонка: Waters BEH C18, 2,0 x 50 мм, частицы 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония;

температура: 50 °C; Градиент: 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 0,5 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм, ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 8,11 (д, *J* = 8,4 Гц, 1H), 8,00–7,95 (м, 1H), 7,94–7,88 (м, 1H), 7,73 (т, *J* = 7,7 Гц, 1H), 7,51 (дд, *J* = 8,1, 5,9 Гц, 4H), 7,16 (т, *J* = 8,6 Гц, 4H), 4,53 (с, 1H), 3,31 (уш.с, 4H), 2,57 (уш.с, 4H).

ПРИМЕР 13

4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-3-нитрохинолин-2(1H)-он

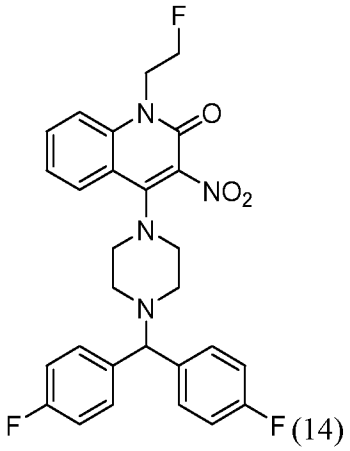


(13)

К 4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-2-хлор-3-нитрохинолину (600 мг, 1,212 ммоль) добавляли AcOH (10 мл, 175 ммоль) и воду (2,5 мл). Реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 5 часов. Растворитель удаляли и добавляли дихлорметан с получением 450 мг твердого вещества желтого цвета (3:1 продукта к исходному материалу). Оставшийся материал очищали с помощью Biotage (от 1:4 до 1:1 Hex/EtOAc; колонка с силикагелем 40 г). Собирали фракции с получением продукта (190 мг) в виде твердого вещества желтого цвета.

ПРИМЕР 14

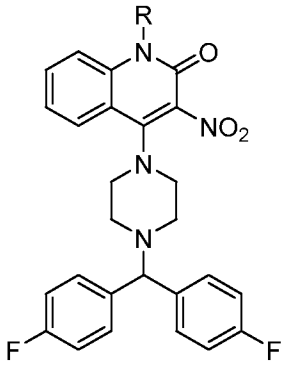
4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-(2-фторэтил)-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он



(14)

К раствору в DMF примера 13 (20 мг, 0,042 ммоль) добавляли гидрид натрия (2,015 мг, 0,084 ммоль) при 0°C. Через 5 минут добавляли 1-фтор-2-иодэтан (14,60 мг, 0,084 ммоль) и реакционный сосуд встряхивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. ЖХ/МС показала конверсию в продукт. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ЖХ/МС при следующих условиях: Колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы 5 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетатом аммония; Градиент: 60-100% B в течение 15 минут, затем 5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили центробежным испарением. Расчетная молекулярная масса 522,528. Условия ЖХ\МС; Waters BEH C18, 2,0 x 50 мм, частицы размером 1,7 мкм; Подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; Подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50 °C; Градиент: 0% B, 0-100% B в течение 3 минут, затем 0,5-минутная выдержка при 100% B; Поток: 1 мл/мин; Детектирование: УФ при 220 нм Наблюдаемый MS-ион 523,1, время удерживания 2,41 минуты.

Следующие соединения были приготовлены в формате библиотеки из соответствующего алкилгалогенида с использованием описанной выше процедуры. Аналитические условия ЖХ-МС, используемые для подтверждения наличия продукта, были идентичны условиям в описанной выше процедуре, за исключением случаев, когда ацетонитрил в подвижной фазе был заменен метанолом, как указано.



Номер примера	R	Время удерживания ЖХ/МС в минутах (подвижная фаза)	ЖХ/МС наблюдаемый ион
15	$-CH_2CN$	3,07 (метанол)	516,1
16	$-CH_2CH=CH_2$	2,54 (ацетонитрил)	517,2

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ

Фармакологические свойства соединений по данному изобретению могут быть подтверждены рядом биологических анализов. Примеры биологических анализов, приведенные ниже, были выполнены с соединениями по изобретению.

Анализ 1: Анализы ингибирования DGK in vitro – Способ A

Реакции с DGKα и DGKζ проводили с использованием экструдированных липосом (анализы LIPGLO с DGKα и DGKζ). Реакции проводили в 50 мМ MOPS pH 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мкМ $CaCl_2$ и 1 мМ DTT (буфер для анализа). Концентрации липидного субстрата составляли 2 мМ PS, 0,25 мМ DAG и 2,75 мМ PC для реакций с экструдированными липосомами. Реакции проводили в 150 μM АТФ. Концентрации фермента для DGKα и DGKζ составляли 5 нМ.

Исследования ингибирования соединений проводили следующим образом: 50 нл капель каждого тестируемого соединения (максимальная концентрация 10 мМ, серия 3-кратных разведений с 11 точками для каждого соединения), растворенных в DMSO, переносили в лунки белого 1536-луночного планшета (Corning 3725). 5 мл раствора фермента/липидного субстрата с 2-кратной конечной реакционной концентрацией готовили путем объединения 2,5 мл 4-кратного раствора фермента

(20 нМ DGKα или DGKζ (приготовленного, как описано ниже) в буфере для анализа) и 2,5 мл 4-кратного липосомального раствора (составы описаны ниже) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в лунки, содержащие тестируемое соединение, добавляли 1 мкл 2-кратного раствора фермента/субстрата, и реакции инициировали добавлением 1 мкл 300 мкМ АТФ. Реакциям давали возможность 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 для обнаружения киназ (Kinase Detection Reagent) и инкубировали в течение 30 минут. Люминесценцию регистрировали с помощью микропланшетного ридера EnVision. Процентное ингибирование рассчитывали по конверсии АТФ, генерируемой реакциями без ферментативного контроля для 100% ингибирования, и реакциями только с носителем для 0% ингибирования. Соединения оценивали при 11 концентрациях для определения IC_{50}.

Приготовление 4-кратных липосом

Липидный состав представлял собой 5 мол.% DAG (Avanti 800811O), 40 мол.% PS (Avanti 840035P) и 55 мол.% PC (Avanti 850457) при общей концентрации липидов 15,2 мг/мл для 4-кратного 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 $MgCl_2$ и замораживали-оттаивали пять раз. Суспензию липидов экструдировали через поликарбонатный фильтр 100 нм 11 раз. Для подтверждения размера липосом (радиус 50-60 нм) проводили динамическое светорассеяние. Липосомный препарат хранили при 4°C в течение четырех недель.

Бакуловирусная экспрессия человеческих DGKα и DGKζ

Образцы бакуловируса с DGK-alpha-TVMV-His-pFBgate человека и с DGK-zeta-transcript variant-2-TVMV-His-pFBgate человека были созданы с использованием системы экспрессии бакуловируса Bac-to-Bac (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. ДНК, используемые для экспрессии DGK-альфа и DGK-дзета, имеют SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Амплификацию бакуловируса проводили с использованием инфицированных клеток Sf9 в соотношениях 1:1500

вирус/клетка и выращивали в течение 65 часов при 27 °C после трансфекции.

Увеличение экспрессии для каждого белка проводили в системе Cellbag 50L WAVE-BioreactoRSystem 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 в соотношениях 1:200 вирус/клетка и выращивали в течение 66-68 часов при 27 °C после заражения. Зараженную культуру клеток собирали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в центрифуге SORVALL® RC12BP. Осадки клеток хранили при -70 ºC до очистки.

Очистка человеческих DGK-альфа и DGK-дзета

Полноразмерные DGKα и DGKζ, каждая экспрессированная и содержащая TVMV-расщепляемую С-концевую последовательность метки Hexa-His (SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно), и полученная, как описано выше, были очищены из пасты из клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Клетки лизировали способом азотной кавитации с азотной бомбой (Parr Instruments), лизаты очищали центрифугированием. Осветленные лизаты очищали до ~90 % гомогенности с использованием трех последовательных стадий колоночной хроматографии в системе ÄKTA Purifier Plus. Трехстадийная колоночная хроматография включала захват никелевой аффинной смолой (т.е. неочищенный HisTrap FF, GE Healthcare) с последующей хроматографией с исключением размера (т. е. HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare для DGK-alpha и HiPrep 26/600 Sephacryl S 300_HR, GE Healthcare для DGK-zeta). Третьей стадией была ионообменная хроматография, и она различалась для двух изоформ. DGKα окончательно очищали с помощью анионообменной хроматографии на Q-Sepharose (GE Healthcare). DGKζ окончательно очищали с помощью катионообменной хроматографии SP Sepharose (GE Healthcare). Белки доставляли в концентрациях ≥2 мг/ мл. Буферы состава были идентичными для обоих белков: 50 мМ Hepes, pH 7,2, 500 мМ NaCl, 10% об./об. глицерина, 1 мМ TCEP и 0,5 мМ EDTA.

Анализ 2: Анализы ингибирования DGK in vitro – Способ B

Реакции с DGKα и DGKζ проводили с использованием экструдированных

липосом (анализы DGKα и DGKζ LIPGLO) Реакции проводили в 50 мМ MOPS pH 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мкМ $CaCl_2$ и 1 мМ DTT (буфер для анализа). Концентрации липидного субстрата составляли 2 мМ PS, 0,25 мМ DAG и 2,75 мМ PC для реакций с экструдированными липосомами (5 мМ общего липида). Реакции проводили в 150 μМ АТФ. Концентрации фермента для DGK α и DGK ζ составляли 5 нМ.

Исследования ингибирования соединений проводили следующим образом: 25 нл капель каждого тестируемого соединения (максимальная концентрация 10 мМ, серия 3-кратных разведений с 11 точками для каждого соединения), растворенных в DMSO, переносили в лунки белого 1536-луночного планшета (Corning 3725). 5 мл раствора фермента/липидного субстрата с 2-кратной конечной реакционной концентрацией готовили путем объединения 2,5 мл 4-кратного раствора фермента (20 нМ DGKα или DGKζ (приготовленного, как описано ниже) в буфере для анализа) и 2,5 мл 4-кратного липосомального раствора (составы описаны ниже) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в лунки, содержащие тестируемое соединение, добавляли 1 мкл 2-кратного раствора фермента/субстрата, и реакции инициировали добавлением 1 мкл 300 мкМ АТФ. Реакциям давали возможность протекать в течение 2 часов, после чего добавляли 2 мкл реагента Glo (Promega V9101) и инкубировали в течение 40 минут. Затем добавляли 4 мкл реагента для обнаружения киназ и инкубировали в течение 30 минут. Люминесценцию регистрировали с помощью микропланшетного ридера EnVision. Процентное ингибирование рассчитывали по конверсии АТФ, генерируемой реакциями без ферментативного контроля для 100% ингибирования, и реакциями только с носителем для 0% ингибирования. Соединения оценивали при 11 концентрациях для определения IC_{50}.

Приготовление 2-кратных липосом

Липидный состав представлял собой 5 мол.% DAG (Avanti 800811O), 40 мол.% PS (Avanti 840035P) и 55 мол.% PC (Avanti 850457) при общей концентрации липидов 7-8 мг/мл для 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 $MgCl_2$ и

замораживали-оттаивали пять раз. Суспензию липидов экструдировали через поликарбонатный фильтр 100 нм 10-12 раз. Для подтверждения размера липосом (радиус 50-60 нм) проводили динамическое светорассеяние. Липосомный препарат хранили при 4°C в течение четырех недель.

Бакуловирусная экспрессия человеческих DGKα почти полной длины и полноразмерной DGKζ

Образцы бакуловируса с MA-hDGKα-(S9-S727)-Ct-TVMV-His-pFBgate человека и полноразмерного DGK-ζ-transcript variant-2-TVMV-His-pFBgate человека были созданы с использованием бакуловирусной экспрессионной системы Bac-to-Bac (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя (примечание: MA- в названии реагентов DGKα означает две дополнительные аминокислоты, добавленные перед Ser-9). ДНК, используемые для экспрессии DGK-α (9-727) и DGK-ζ , имеют SEQ ID NO: 5 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 белка DGK-α(9-727) почти полной длины проводили в 2-литровых колбах, и полноразмерную DGKζ получали с использованием системы Cellbag 50 L WAVE-Bioreactor System 20/50 от GE Healthcare Bioscience. Белки экспрессировали в разных объемах в сходных условиях. Для экспрессии DGKα(9-727) использовали 2 сосуда по 2 л, каждый из которых содержал 0,8 л конечного объема культуральной среды, и DGKζ выращивали в размере 12 л в клеточном мешке Cellbag на 50 л. Для каждого белка клетки Sf9 с исходной плотностью 2×10^6 клеток/мл (Expression System, Davis, CA) высевали в среду для насекомых ESF921 (Expression System), инфицировали исходным вирусом в соотношении вирус/клетка 1:200 и выращивали в течение 66-68 часов при 27 °C после заражения. Зараженные культуры клеток собирали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин при 4 °C в центрифуге SORVALL® RC12BP. Осадки клеток хранили при -80°C до очистки.

Очистка человеческих DGK-альфа и DGK-дзета

Человеческие αDGK(9-727) и полноразмерная DGKζ, каждая экспрессированная и содержащая TVMV-расщепляемую С-концевую последовательность метки Hexa-His (SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно), и полученная, как описано выше, были очищены из пасты из клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Клеточные пасты оттаивали и суспендировали в буфере (50 мМ HEPES, pH 7,2, 300 мМ NaCl, 10% об./об. глицерина, 1 мМ TCEP, содержащий ингибиторы бензоназы и протеазы) до 1:10 об./об. исходного объема культуры. Лизис осуществляли способом азотной кавитации с азотной бомбой (Parr Instruments), лизаты очищали высокоскоростным центрифугированием. Осветленные лизаты очищали до ~90% гомогенности с использованием двух или трех последовательных стадий колоночной хроматографии, соответственно, в системе ÄKTA Purifier Plus. Обе изоформы очищали способом никель-аффинной хромотографии с элюированием в градиенте имидазола (т.е. HisTrap FF, GE Healthcare), с последующей хроматографией с исключением размера (т.е. HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare, для DGKα(9-727) и HiPrep 26/600 Sephacryl S 300 HR, GE Healthcare, для DGKζ). Данные две стадии давали DGKα(9-727) с чистотой >90%. Для достижения аналогичной чистоты для полноразмерной DGKζ потребовалась третья стадия, использующая катионообменную хроматографию (SP Sepharose FF, GE Healthcare) и элюирование градиентом NaCl. Окончательные буферы состава были сходными для обоих белков: DGKα(9-727), приготовленная в 50 мМ Hepes, pH 7,3, 300 мМ NaCl, 10% об./об. глицерина и 1 мМ TCEP, и полноразмерная DGKζ, приготовленная в 50 мМ Hepes, pH 7,3, 500 мМ NaCl, 5% об./об. глицерина и 1 мМ TCEP. Белки концентрировали до 1-2 мг/мл, мгновенно замораживали и хранили при -80 °C для длительного хранения.

Анализ 3: анализ на IL2 Raji и CD4 Т-клеток

Анализ на IL-2 в 1536 лунках проводили в объеме 4 мкл с использованием предварительно активированных CD4 Т-клеток и клеток Раджи (Raji). Перед анализом CD4 Т-клетки предварительно активировали обработкой α-CD3, α-CD28 и PHA в дозах 1,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно. Клетки Раджи обрабатывали стафилококковым энтеротоксином B (SEB) в концентрации 10000

нг/мл. Серийно разведенные соединения сначала переносили в 1536-луночный планшет для анализа (Corning, #3727), затем добавляли 2 мкл предварительно активированных CD4 Т-клеток (конечная плотность 6000 клеток/лунку) и 2 мкл обработанных SEB клеток Раджи (2000 клеток/лунку). После 24 часов инкубации в инкубаторе при 37 °C/5% CO_2 в планшет для анализа добавляли 4 мкл реагентов для обнаружения IL-2 (Cisbio, #64IL2PEC). Аналитические планшеты считывали на ридере Envision. Для оценки цитотоксичности соединения клетки Raji или CD4 Т-клетки инкубировали с серийно разбавленными соединениями. После инкубации в течение 24 часов добавляли 4 мкл Cell Titer Glo (Promega, #G7572) и планшеты считывали на ридере Envision. Эффективную концентрацию 50 % (IC_{50}) рассчитывали по четырехпараметрической логистической формуле y = A+((B-A)/(1+((C/x)^D))), где A и B обозначают минимальный и максимальный % активации или ингибирования, соответственно, C представляет собой IC_{50}, D представляет собой угловой коэффициент Хилла и x представляет концентрацию соединения.

Анализ 4: Анализ CellTiter-Glo пролиферации CD8 Т-клеток

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека 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 с 20 мкл анти-CD3 человека в концентрации 0,1 мкл/мл в чистом RPMI, который удаляли с планшета перед добавлением в каждую лунку 20 тыс./40 мкл CD8 Т-клеток с 0,5 мгл/мл растворимого анти-человеческого CD28. Соединения немедленно переносили на клеточный планшет сразу после посева клеток. После инкубации в течение 72 ч при 37 °C в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента CellTiter-glo (номер по каталогу Promega G7570). Планшет энергично встряхивали в течение 5 минут, инкубировали при комнатной температуре еще 15 минут и считывали на ридере Envision пролиферацию CD8 Т-клеток. При анализе 0,1 мкг/мл анти-CD3 и 0,5 мкг/мл анти-CD28 стимулированного сигнала CD8 Т-клеток были фоном. 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, в концентрации 3 мкМ использовали для установки диапазона 100 %, и EC_{50} использовали при абсолютном значении 50 % для нормализации данных.

Анализ 5: DGK AP1-репортерный анализ

Jurkat AP1-luciferase Reporter был создан с использованием набора Cignal Lenti AP1 Reporter (luc) от SABiosciences (CLS-011L).

Соединения переносили из планшета Echo LDV в отдельные лунки 384-луночного планшета (белый, с твердым дном, непрозрачный PE CulturPlate 6007768) с использованием прибора Echo550. Размер пробы составлял 30 нл на лунку; и один целевой 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 $1,35\times10^6$ клеток/мл. Клетки добавляли вручную с помощью многоканальной пипетки, 30 мкл /лунка клеточной суспензии, в 384-луночный ТС планшет, содержащий соединения, $4,0\times10^4$ клеток на лунку. Планшеты с клетками инкубировали в течение 20 минут при 37°C и 5% CO_2.

Во время инкубации готовили растворы антител к CD3 (αCD3) путем смешивания 3 мкл /αCD3 (1,3 мг/мл) с 10 мл среды [конечная концентрация = 0,4 мкл/мл]. Затем 1,5 мкл αCD3 (1,3 мг/мл) смешивали с 0,5 мл среды [конечная концентрация = 4 мкл/мл]. Через 20 минут 10 мкл среды добавляли во все лунки в колонке 1, лунки от A до M, и 10 мкл αCD3 (4 мкг/мл) на лунку добавляли в колонку 1, ряды с N по P для сравнения. Затем с помощью многоканальной пипетки добавляли 10 мкл αCD3 (0,4 мкг/мл) на лунку. Стимулированные αCD3 клетки, $^+$/- обработанные соединением, инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 6 часов.

В течение данного 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 с помощью многокапельного комби-дозатора. Пузырьки удаляли центрифугированием (2000 об/мин, температура окружающей среды, 10 сек). Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Образцы были охарактеризованы путем измерения относительных единиц освещенности (RLU) с использованием прибора для считывания 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.

Анализ 6: Анализ мышиных цитотоксических Т-лимфоцитов

Анализ цитотоксических Т-лимфоцитов (cytolytic T-cell (CTL)) был разработан для функциональной оценки способности ингибиторов DGKα и DGKζ усиливать опосредованную эффекторными Т-клетками активность уничтожения опухолевых клеток. $CD8^+$ Т-клетки, выделенные из трансгенной мыши OT-1, распознают антигенпрезентирующие клетки, MC38, которые презентируют полученный из овальбумина пептид SIINFEKL. Распознавание родственного 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 выделяли и размножали в присутствии пептида SIINFEKL в концентрации 1 мкг/мл и mIL2 в концентрации 10 Ед/мл. Через три дня добавляли свежую среду с mIL 2 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 (3 раза) свежей средой для удаления избытка пептида. Наконец, клетки CTL, которые предварительно обрабатывали ингибиторами DGKв 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 при 700 об/мин в течение 5 минут и помещали в инкубатор на ночь при 37 °C. Через 24 часа супернатант собирали для анализа уровней цитокинов IFN-γ с помощью набора AlphaLisa, приобретенного у Perkin Elmer.

Анализ 7: PHA-Анализ пролиферации

Стимулированные фитогемагглютинином (PHA) бластные клетки из замороженных запасов 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 к 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% CO_2 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)-2H-тетразолий] в соответствии с инструкциями производителя (Promega, Madison, WI). Процент ингибирования рассчитывали, сравнивая значения между стимулированным IL2 (0% ингибирование) и нестимулированным контролем (100% ингибирование). Определения концентрации ингибирования (IC_{50}) проводили по зависимости кратности индукции от степени стимуляции на интервале значений между стимулированной IL2 и нестимулированной IL2 обработками, исходя из величины, соответствующей 50% ингибирования.

Анализ 8: Анализ на IFN-γ CD8 Т-клеток человека

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 часов при 37 °C и подсчитывали. 384-луночный планшет для тканевых культур покрывали в течение ночи при 4 °C с 20 мкл анти-CD3 человека в концентрации 0,05 мкг/мл в PBS, который удаляли с планшета перед добавлением в каждую лунку 40000 клеток на 40 микролитров CD8 Т-клеток с 0,1 мкг/мл растворимого античеловеческого CD28. Соединения переносились с помощью жидкостного манипулятора Echo в планшет с клетками сразу после того, как клетки были помещены в планшет. После 20-часовой инкубации при 37 °C супернатанты по 3 микролитра на лунку переносили в новый 384-луночный белый планшет для анализа для измерения цитокинов.

Интерферон-γ (IFN-γ) количественно определяли с использованием набора AlphLISA (Cat#AL217), как описано в руководстве производителя (Perkin Elmer). Подсчеты в каждой лунке переводили в концентрацию IFN-γ (пг/мл). Значения EC_{50} соединения 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 как 100% активации.

Анализ 9: Анализ на pERK CD8 Т-клеток человека

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 часов при 37 °C и подсчитывали. Положительные 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 mAb против человеческого CD3 и против CD28 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 (Perkin Elmer, Cat#ALSU-PERK-A). Лизат (5 мкл на лунку) переносили в новый 384-луночный белый планшет для анализа для измерения активации pERK.

EC_{50} соединения определяли путем установки анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве исходного уровня и совместной стимуляции 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 с анти-CD3 плюс анти-CD28 как 100% активации.

Анализ 10: Анализ на IFN-γ цельной крови человека

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 95% воздуха/5% CO_2. 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-γ в супернатантах измеряли с использованием набора AlphLISA (Cat#AL217).

EC_{50} соединения определяли путем установки анти-CD3 плюс 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 как 100% активации.

Анализ 11: DGK-Анализ на pERK цельной крови человека

Анализ фосфорилирования ERK в цельной крови человека проводили с цельной венозной кровью человека, полученной от здоровых доноров (отобранной с гепарином в качестве антикоагулянта). Серийные разведения соединений (11 точек, 3-кратные) в DMSO добавляли в 384-луночные планшеты по 20 нл/лунку с использованием акустического дозатора ECHO 550 (Labcyte) до достижения конечной начальной концентрации 20 мкМ в пробе для анализа. Гепаринизированную цельную кровь человека добавляли в планшет с соединением по 9 мкл на лунку и инкубировали в течение одного часа при 37°C во влажном инкубаторе 95% воздуха/5% CO_2. После одного часа инкубации соединения в лунку добавляли 1 мкл человеческого анти-CD3-антитела (внутреннего производства) в присутствии сшивающего антитела козьего анти-мышиного IgG (4 мкг /мл) в конечной концентрации 1 мкг /мл для стимуляции реакционного пути и дополнительно инкубировали в течение 15 минут при 37 °C. Стимуляцию прекращали добавлением 90 мкл буфера Fix/Lyse (BD 558049) . Клетки промывали и окрашивали антителами против CD8 PE (BD 555635) в течение 60 минут при комнатной температуре, снова промывали и подвергали пермеабилизации на льду с использованием буфера Perm III (BD 558050) в течение 30 минут. Затем клетки окрашивали Alexa Fluor® 647 анти-ERK1/2 Phospho (Thr202/Tyr204) антителом (Bioleged 675504) в течение 60 минут в разведении 1:50. Образцы промывали и ресуспендировали в dPBS, содержащем 1% BSA (dPBS, Gibco 14190136; BSA, Sigma-Aldrich A9205). Образцы анализировали с помощью прибора Intellicyt® iQue Screener PLUS. Активацию pERK количественно оценивали по проценту pERK-положительной популяции среди CD8-положительной популяции. Расчеты активности соединения были основаны на внутреннем соединении в концентрации 20 мкМ как 100% активации и анти-CD3-контроле как 0% активации.

Таблица А

Значения активности IC_{50} ингибирования DGK in vitro

Пример №	DGKα LIPGLO IC_{50} (мкМ)	DGKζ LIPGLO IC_{50} (мкМ)
1	0,0073	41

2	0,051	35
4	0,15	7,9
5	0,50	>240
6	0,7	>27
7	1,3	>250
8	39	82
11	90	>240

В таблице А приведены значения активности IC_{50} ингибирования DGK in vitro, измеренные в липосомных анализах DGKα и DGKζ (LIPGLO).

Соединения по настоящему изобретению обладают активностью ингибитора(ов) одного или обоих ферментов DGKα и DGKζ и, следовательно, могут быть использованы для лечения заболеваний, связанных с ингибированием активности DGKα и DGKζ.

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

```
  1   ATGGCCAAGG AGAGGGGCCT AATAAGCCCC AGTGATTTTG CCCAGCTGCA
 51   AAAATACATG GAATACTCCA CCAAAAAGGT CAGTGATGTC CTAAAGCTCT
101 TCGAGGATGG CGAGATGGCT AAATATGTCC AAGGAGATGC CATTGGGTAC
151 GAGGGATTCC AGCAATTCCT GAAAATCTAT CTCGAAGTGG ATAATGTTCC
201 CAGACACCTA AGCCTGGCAC TGTTTCAATC CTTTGAGACT GGTCACTGCT
251 TAAATGAGAC AAATGTGACA AAAGATGTGG TGTGTCTCAA TGATGTTTCC
301 TGCTACTTTT CCCTTCTGGA GGGTGGTCGG CCAGAAGACA AGTTAGAATT
351 CACCTTCAAG CTGTACGACA CGGACAGAAA TGGGATCCTG GACAGCTCAG
401  AAGTGGACAA AATTATCCTA CAGATGATGC GAGTGGCTGA ATACCTGGAT
451  TGGGATGTGT CTGAGCTGAG GCCGATTCTT CAGGAGATGA TGAAAGAGAT
501 TGACTATGAT GGCAGTGGCT CTGTCTCTCA AGCTGAGTGG GTCCGGGCTG
551 GGGCCACCAC CGTGCCACTG CTAGTGCTGC TGGGTCTGGA GATGACTCTG
601 AAGGACGACG GACAGCACAT GTGGAGGCCC AAGAGGTTCC CCAGACCAGT
651 CTACTGCAAT CTGTGCGAGT CAAGCATTGG TCTTGGCAAA CAGGGACTGA
701 GCTGTAACCT CTGTAAGTAC ACTGTTCACG ACCAGTGTGC CATGAAAGCC
751 CTGCCTTGTG AAGTCAGCAC CTATGCCAAG TCTCGGAAGG ACATTGGTGT
801 CCAATCACAT GTGTGGGTGC GAGGAGGCTG TGAGTCCGGG CGCTGCGACC
851 GCTGTCAGAA AAAGATCCGG ATCTACCACA GTCTGACCGG GCTGCATTGT
901 GTATGGTGCC ACCTAGAGAT CCACGATGAC TGCCTGCAAG CGGTGGGCCA
951 TGAGTGTGAC TGTGGGCTGC TCCGGGATCA CATCCTGCCT CCATCTTCCA
1001      TCTATCCCAG TGTCCTGGCC TCTGGACCGG ATCGTAAAAA TAGCAAAACA
1051      AGCCAGAAGA CCATGGATGA TTTAAATTTG 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      CCAGTTTTGC 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      ACCCCATGGG GATATCTATG GGATCAACCA GGCCTTAGGT GCTACAGCTA
1901      AAGTCATCAC CGACCCTGAT ATCCTGAAAA CCTGTGTACC AGACCTAAGT
1951      GACAAGAGAC TGGAAGTGGT TGGGCTGGAG GGTGCAATTG AGATGGGCCA
2001      AATCTATACC AAGCTCAAGA ATGCTGGACG TCGGCTGGCC AAGTGCTCTG
2051      AGATCACCTT CCACACCACA AAAACCCTTC CCATGCAAAT TGACGGAGAA
2101      CCCTGGATGC AGACGCCCTG TACAATCAAG ATCACCCACA AGAACCAGAT
2151      GCCCATGCTC ATGGGCCCAC CCCCCCGCTC CACCAATTTC TTTGGCTTCT
2201      TGAGCGGATC CTCGGAGACA GTGCGGTTTC AGGGACACCA CCACCATCAC
2251      CACTGA
```

(SEQ ID NO: 1)

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

```
0001 MAKERGLISP SDFAQLQKYM EYSTKKVSDV LKLFEDGEMA KYVQGDAIGY EGFQQFLKIY 0060
0061 LEVDNVPRHL SLALFQSFET GHCLNETNVT KDVVCLNDVS CYFSLLEGGR PEDKLEFTFK 0120
0121 LYDTDRNGIL DSSEVDKIIL QMMRVAEYLD WDVSELRPIL QEMMKEIDYD GSGSVSQAEW 0180
0181 VRAGATTVPL LVLLGLEMTL KDDGQHMWRP KRFPRPVYCN LCESSIGLGK QGLSCNLCKY 0240
0241 TVHDQCAMKA LPCEVSTYAK SRKDIGVQSH VWVRGGCESG RCDRCQKKIR IYHSLTGLHC 0300
0301 VWCHLEIHDD CLQAVGHECD CGLLRDHILP PSSIYPSVLA SGPDRKNSKT SQKTMDDLNL 0360
0361 STSEALRIDP VPNTHPLLVF VNPKSGGKQG QRVLWKFQYI LNPRQVFNLL KDGPEIGLRL 0420
0421 FKDVPDSRIL VCGGDGTVGW ILETIDKANL PVLPPVAVLP LGTGNDLARC LRWGGGYEGQ 0480
0481 NLAKILKDLE MSKVVHMDRW SVEVIPQQTE EKSDPVPFQI INNYFSIGVD ASIAHRFHIM 0540
0541 REKYPEKFNS RMKNKLWYFE FATSESIFST CKKLEESLTV EICGKPLDLS NLSLEGIAVL 0600
0601 NIPSMHGGSN LWGDTRRPHG DIYGINQALG ATAKVITDPD ILKTCVPDLS DKRLEVVGLE 0660
0661 GAIEMGQIYT KLKNAGRRLA KCSEITFHTT KTLPMQIDGE PWMQTPCTIK ITHKNQMPML 0720
0721 MGPPPRSTNF FGFLSGSSET VRFQGHHHHH H  0751
```

(SEQ ID NO: 2)

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

```
  1   ATGGAGCCGC GGGACGGTAG CCCCGAGGCC CGGAGCAGCG ACTCCGAGTC
 51   GGCTTCCGCC TCGTCCAGCG GCTCCGAGCG CGACGCCGGT CCCGAGCCGG
101 ACAAGGCGCC GCGGCGACTC AACAAGCGGC GCTTCCCGGG GCTGCGGCTC
151 TTCGGGCACA GGAAAGCCAT CACGAAGTCG GGCCTCCAGC ACCTGGCCCC
201 CCCTCCGCCC ACCCCTGGGG CCCCGTGCAG CGAGTCAGAG CGGCAGATCC
251 GGAGTACAGT GGACTGGAGC GAGTCAGCGA CATATGGGGA GCACATCTGG
301 TTCGAGACCA ACGTGTCCGG GGACTTCTGC TACGTTGGGG AGCAGTACTG
351 TGTAGCCAGG ATGCTGCAGA AGTCAGTGTC TCGAAGAAAG TGCGCAGCCT
401 GCAAGATTGT GGTGCACACG CCCTGCATCG AGCAGCTGGA GAAGATAAAT
```

```
 451  TTCCGCTGTA AGCCGTCCTT CCGTGAATCA GGCTCCAGGA ATGTCCGCGA
 501 GCCAACCTTT GTACGGCACC ACTGGGTACA CAGACGACGC CAGGACGGCA
 551 AGTGTCGGCA CTGTGGGAAG GGATTCCAGC AGAAGTTCAC CTTCCACAGC
 601 AAGGAGATTG TGGCCATCAG CTGCTCGTGG TGCAAGCAGG CATACCACAG
 651 CAAGGTGTCC TGCTTCATGC TGCAGCAGAT CGAGGAGCCG TGCTCGCTGG
 701 GGGTCCACGC AGCCGTGGTC ATCCCGCCCA CCTGGATCCT CCGCGCCCGG
 751 AGGCCCCAGA ATACTCTGAA AGCAAGCAAG AAGAAGAAGA GGGCATCCTT
 801 CAAGAGGAAG TCCAGCAAGA AAGGGCCTGA GGAGGGCCGC TGGAGACCCT
 851 TCATCATCAG GCCCACCCCC TCCCCGCTCA TGAAGCCCCT GCTGGTGTTT
 901 GTGAACCCCA AGAGTGGGGG CAACCAGGGT GCAAAGATCA TCCAGTCTTT
 951 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 CCCCGAGGCA GGGCCTGAGG
1301      ACCGAGATGA AGGCGCCACC GACCGGTTGC CCCTGGATGT CTTCAACAAC
1351      TACTTCAGCC TGGGCTTTGA CGCCCACGTC ACCCTGGAGT TCCACGAGTC
1401      TCGAGAGGCC AACCCAGAGA AATTCAACAG CCGCTTTCGG AATAAGATGT
1451      TCTACGCCGG GACAGCTTTC TCTGACTTCC TGATGGGCAG CTCCAAGGAC
1501      CTGGCCAAGC ACATCCGAGT GGTGTGTGAT GGAATGGACT TGACTCCCAA
1551      GATCCAGGAC CTGAAACCCC AGTGTGTTGT TTTCCTGAAC ATCCCCAGGT
1601      ACTGTGCGGG CACCATGCCC TGGGGCCACC CTGGGGAGCA CCACGACTTT
1651      GAGCCCCAGC GGCATGACGA CGGCTACCTC GAGGTCATTG GCTTCACCAT
1701      GACGTCGTTG GCCGCGCTGC AGGTGGGCGG ACACGGCGAG CGGCTGACGC
1751      AGTGTCGCGA GGTGGTGCTC ACCACATCCA AGGCCATCCC GGTGCAGGTG
1801      GATGGCGAGC CCTGCAAGCT TGCAGCCTCA CGCATCCGCA TCGCCCTGCG
1851      CAACCAGGCC ACCATGGTGC AGAAGGCCAA GCGGCGGAGC GCCGCCCCCC
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 AAACTGTCCC CCAAGTGGTG
2151      CTTCCTGGAC 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 CCCCCCAGAG
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 hDGKζ-(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 KEIVAISCSW CKQAYHSKVS CFMLQQIEEP CSLGVHAAVV 0240
0241 IPPTWILRAR RPQNTLKASK KKKRASFKRK SSKKGPEEGR WRPFIIRPTP SPLMKPLLVF 0300
0301 VNPKSGGNQG AKIIQSFLWY LNPRQVFDLS QGGPKEALEM YRKVHNLRIL ACGGDGTVGW 0360
0361 ILSTLDQLRL KPPPPVAILP LGTGNDLART LNWGGGYTDE PVSKILSHVE EGNVVQLDRW 0420
0421 DLHAEPNPEA GPEDRDEGAT DRLPLDVFNN YFSLGFDAHV TLEFHESREA NPEKFNSRFR 0480
0481 NKMFYAGTAF SDFLMGSSKD LAKHIRVVCD GMDLTPKIQD LKPQCVVFLN IPRYCAGTMP 0540
0541 WGHPGEHHDF EPQRHDDGYL EVIGFTMTSL AALQVGGHGE RLTQCREVVL TTSKAIPVQV 0600
0601 DGEPCKLAAS RIRIALRNQA TMVQKAKRRS AAPLHSDQQP VPEQLRIQVS RVSMHDYEAL 0660
0661 HYDKEQLKEA SVPLGTVVVP GDSDLELCRA HIERLQQEPD GAGAKSPTCQ KLSPKWCFLD 0720
0721 ATTASRFYRI DRAQEHLNYV TEIAQDEIYI LDPELLGASA RPDLPTPTSP 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)

Нуклеотидная последовательность, MA-hDGKα-(S9-S727)-Ct-TVMV-His:

```
0001 ATGGCTTCCC CAAGCGACTT CGCCCAGCTG CAGAAGTACA TGGAATACAG CACCAAGAAG 0060
0061 GTGTCTGACG TCCTGAAGCT GTTCGAGGAC GGTGAAATGG CTAAGTACGT CCAGGGCGAC 0120
0121 GCTATCGGAT ACGAGGGATT CCAGCAGTTC CTGAAGATCT ACCTGGAAGT GGACAACGTC 0180
0181 CCCAGGCACC TGTCACTGGC TCTGTTCCAG TCCTTCGAGA CTGGCCACTG CCTGAACGAA 0240
0241 ACCAACGTCA CTAAGGACGT GGTCTGCCTG AACGACGTGA GCTGCTACTT CTCTCTGCTG 0300
0301 GAGGGTGGCA GACCAGAGGA CAAGCTGGAA TTCACCTTCA AGCTGTACGA CACTGACCGC 0360
0361 AACGGAATCC TGGACTCCAG CGAAGTGGAC AAGATCATCC TGCAGATGAT GCGTGTCGCT 0420
0421 GAGTACCTGG ACTGGGACGT GAGCGAACTG AGGCCTATCC TGCAGGAGAT GATGAAGGAA 0480
0481 ATCGACTACG ACGGCTCTGG ATCAGTGTCC CAGGCTGAGT GGGTCCGCGC TGGTGCTACC 0540
0541 ACTGTGCCAC TGCTGGTCCT GCTGGGACTG GAAATGACCC TGAAGGACGA CGGTCAGCAC 0600
0601 ATGTGGCGCC CAAAGCGTTT CCCCAGGCCA GTCTACTGCA ACCTGTGCGA GTCTTCAATC 0660
0661 GGTCTGGGCA AGCAGGGCCT GTCATGCAAC CTGTGCAAGT ACACCGTGCA CGACCAGTGC 0720
0721 GCTATGAAGG CCCTGCCCTG CGAGGTCTCA ACTTACGCTA AGTCCCGTAA GGACATCGGA 0780
0781 GTGCAGTCAC ACGTGTGGGT CAGGGGAGGT TGCGAATCCG GTAGATGCGA CCGCTGCCAG 0840
0841 AAGAAGATCC GTATCTACCA CTCCCTGACC GGACTGCACT GCGTCTGGTG CCACCTGGAG 0900
0901 ATCCACGACG ACTGCCTGCA GGCCGTGGGA CACGAATGCG ACTGCGGTCT GCTGCGTGAC 0960
0961 CACATCCTGC CTCCCTCCAG CATCTACCCT TCAGTCCTGG CTTCCGGTCC CGACAGGAAG 1020
1021 AACAGCAAGA CCTCTCAGAA GACTATGGAC GACCTGAACC TGAGCACCTC TGAGGCCCTG 1080
1081 CGCATCGACC CTGTGCCCAA CACTCACCCA CTGCTGGTGT TCGTCAACCC TAAGAGCGGC 1140
1141 GGAAAGCAGG GTCAGAGAGT CCTGTGGAAG TTCCAGTACA TCCTGAACCC ACGCCAGGTG 1200
1201 TTCAACCTGC TGAAGGACGG CCCTGAGATC GGACTGAGAC TGTTCAAGGA CGTGCCCGAC 1260
1261 TCTCGCATCC TCGTCTGCGG TGGCGACGGT ACTGTGGGAT GGATCCTGGA AACTATCGAC 1320
1321 AAGGCTAACC TGCCAGTGCT GCCACCTGTG GCTGTCCTGC CACTGGGAAC CGGTAACGAC 1380
1381 CTGGCTCGTT GCCTGCGTTG GGGAGGTGGC TACGAGGGAC AGAACCTGGC CAAGATCCTG 1440
1441 AAGGACCTGG AAATGAGCAA GGTGGTCCAC ATGGACAGAT GGTCTGTGGA GGTCATCCCA 1500
1501 CAGCAGACTG AGGAAAAGTC AGACCCAGTC CCTTTCCAGA TCATCAACAA CTACTTCAGC 1560
1561 ATCGGTGTGG ACGCTTCTAT CGCCCACAGA TTCCACATCA TGCGCGAGAA GTACCCTGAA 1620
```

```
1621 AAGTTCAACT CCCGCATGAA GAACAAGCTG TGGTACTTCG AGTTCGCTAC CTCAGAATCC 1680
1681 ATCTTCTCAA CTTGCAAGAA GCTGGAGGAA TCCCTGACCG TCGAGATCTG CGGCAAGCCT 1740
1741 CTGGACCTGT CAAACCTGTC CCTGGAAGGC ATCGCTGTGC TGAACATCCC AAGCATGCAC 1800
1801 GGAGGTTCTA ACCTCTGGGG CGACACTAGG AGGCCTCACG GTGACATCTA CGGCATCAAC 1860
1861 CAGGCCCTGG GAGCTACCGC CAAGGTCATC ACTGACCCCG ACATCCTGAA GACCTGCGTG 1920
1921 CCAGACCTGA GCGACAAGCG TCTGGAGGTG GTCGGACTGG AGGGTGCCAT CGAAATGGGC 1980
1981 CAGATCTACA CTAAGCTGAA GAACGCTGGA AGGAGACTGG CCAAGTGCTC TGAGATCACC 2040
2041 TTCCACACCA CTAAGACTCT GCCTATGCAG ATCGACGGTG AACCCTGGAT GCAGACCCCA 2100
2101 TGCACTATCA AGATCACCCA CAAGAACCAG ATGCCCATGC TGATGGGTCC TCCTCCTCGC 2160
2161 TCTGGATCTT CAGAAACTGT GAGGTTCCAG GGCCACCACC ACCACCACCA CTGA  2214
```

(SEQ ID NO: 5)

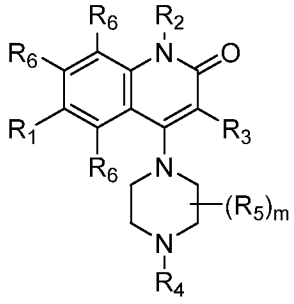
Аминокислотная последовательность MA-hDGKα-(S9-S727)-Ct-TVMV-His:

```
0001 MASPSDFAQL QKYMEYSTKK VSDVLKLFED GEMAKYVQGD AIGYEGFQQF LKIYLEVDNV 0060
0061 PRHLSLALFQ SFETGHCLNE TNVTKDVVCL NDVSCYFSLL EGGRPEDKLE FTFKLYDTDR 0120
0121 NGILDSSEVD KIILQMMRVA EYLDWDVSEL RPILQEMMKE IDYDGSGSVS QAEWVRAGAT 0180
0181 TVPLLVLLGL EMTLKDDGQH MWRPKRFPRP VYCNLCESSI GLGKQGLSCN LCKYTVHDQC 0240
0241 AMKALPCEVS TYAKSRKDIG VQSHVWVRGG CESGRCDRCQ KKIRIYHSLT GLHCVWCHLE 0300
0301 IHDDCLQAVG HECDCGLLRD HILPPSSIYP SVLASGPDRK NSKTSQKTMD DLNLSTSEAL 0360
0361 RIDPVPNTHP LLVFVNPKSG GKQGQRVLWK FQYILNPRQV FNLLKDGPEI GLRLFKDVPD 0420
0421 SRILVCGGDG TVGWILETID KANLPVLPPV AVLPLGTGND LARCLRWGGG YEGQNLAKIL 0480
0481 KDLEMSKVVH MDRWSVEVIP QQTEEKSDPV PFQIINNYFS IGVDASIAHR FHIMREKYPE 0540
0541 KFNSRMKNKL WYFEFATSES IFSTCKKLEE SLTVEICGKP LDLSNLSLEG IAVLNIPSMH 0600
0601 GGSNLWGDTR RPHGDIYGIN QALGATAKVI TDPDILKTCV PDLSDKRLEV VGLEGAIEMG 0660
0661 QIYTKLKNAG RRLAKCSEIT FHTTKTLPMQ IDGEPWMQTP CTIKITHKNQ MPMLMGPPPR 0720
0721 SGSSETVRFQ GHHHHHH  0737
```

(SEQ ID NO: 6)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



(I)

или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, –OH, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, C_{1-3}алкокси, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, $–C(O)NR_aR_a$, $–NR_aR_a$, $–S(O)_nR_e$ или $–P(O)R_eR_e$;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, $–OCH_3$ 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 от нуля до 4 R_{1a};

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

R_3 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1-3} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} фторциклоалкил, $–NO_2$ или пиридинил, замещенный от нуля до 2 R_{3a};

каждый R_{3a} представляет собой галоген, –CN, C_{1-3} алкил или C_{1-3} алкокси;

R_4 представляет собой $–CH_2R_{4a}$, $–CH_2CH_2R_{4a}$, $–CH_2CHR_{4a}R_{4d}$, $–CHR_{4a}R_{4b}$ или $–CR_{4a}R_{4b}R_{4c}$;

R_{4a} и R_{4b} независимо друг от друга представляют собой:

(i) C_{1-6} алкил, замещенный от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –CN, –OH, $–OCH_3$, $–SCH_3$, 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 из которых

замещен от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, –CN, –OH, $C_{1–6}$ алкила, $C_{1–3}$ фторалкила, C_{1-4} гидроксиалкила, $–O(CH)_{1–3}O(C_{1–3}$ алкила), $C_{1–4}$ алкокси, $–O(C_{1–4}$ гидроксиалкила), $–O(CH)_{1–3}O(C_{1–3}$ алкила), $C_{1–3}$ фторалкокси, $–O(CH)_{1–3}NR_cR_c$, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C≡CH$, $–C(O)(C_{1–4}$ 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), $–P(O)(C_{1–3}$ алкила)$_2$, $–S(O)_2(C_{1–3}$ алкила), $–O(CH_2)_{1–2}(C_{3–6}$ циклоалкила), $–O(CH_2)_{1–2}$(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, причем указанная циклическая группа замещена от нуля до 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, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C≡CH$, $–NR_cR_c$, $–NR_aS(O)_2(C_{1–3}$ алкила), $–NR_aC(O)(C_{1–3}$ алкила), $–NR_aC(O)O(C_{1–4}$ алкила) и $C_{3–6}$ 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 от нуля до 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, $–OCH_2CH=CH_2$, $–OCH_2C≡CH$, $–NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из $C_{3–6}$ циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, причем каждая циклическая группа замещена от нуля до 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 от нуля до 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 Rc независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный от нуля до 1 заместителем, выбранным из F, Cl, –CN, $–CH_3$ и $–OCH_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой F, Cl, –CN, –OH, C_{1-6} -алкил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{1-3} алкокси, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-4} алкенил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-4}алкинил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_g, фенил, замещенный от нуля до 4 R_g, оксадиазолил, замещенный от нуля до 3 R_g, пиридинил, замещенный от нуля до 4 R_g, $–(CH_2)_{1-2}$(гетероциклил, замещенный от нуля до 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), или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O;

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), C_{3-5} циклоалкил или $–NR_cR_c$;

каждый R_6 представляет собой H, F, Cl, –CN, $–CH_3$, $–CH_2F$, $–CHF_2$, $–CF_3$ или $–OCH_3$;

m равно нулю, 1, 2 или 3; и

n равно нулю, 1 или 2.

2. Соединение по п. 1 или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, –CN, C_{1-3} алкил, замещенный от нуля до 4 R_{1a}, циклопропил, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, C_{1-3}алкокси, замещенный от нуля до 3 R_{1a}, $–C(O)NR_aR_a$, $–NR_aR_a$, $–S(O)_nCH_3$ 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, C_{1-2} алкил, замещенный от нуля до 2 R_{2a}, или C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 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, C_{1-2} фторалкил, C_{3-4} циклоалкил,

$-NO_2$ или пиридинил, замещенный от нуля до 2 R_{3a};

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

(i) C_{1-4} алкил, замещенный от нуля до 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 от нуля до 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, $-O(C_{1-4}$ гидроксиалкила), $-O(CH)_{1-2}O(C_{1-2}$ 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, 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, причем указанная циклическая группа замещена от нуля до 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), -NRaC(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 от нуля до 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, причем каждая циклическая группа замещена от нуля до 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 от нуля до 4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, –OH, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и –CN;

каждый R_5 независимо представляет собой F, –CN, –OH, C_{1-5} алкил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{1-2} алкокси, замещенный от нуля до 3 R_g, C_{2-3} алкенил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{2-3} алкинил, замещенный от нуля до 4 R_g, C_{3-4} циклоалкил, замещенный от нуля до 4 R_g, фенил, замещенный от нуля до 3 R_g, оксадиазолил, замещенный от нуля до 3 R_g, пиридинил, замещенный от нуля до 3 R_g, $–(CH_2)_{1-2}$(гетероциклил, замещенный от нуля до 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), или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O;

каждый R_6 представляет собой H, F или $–CH_3$; и

m равно нулю, 1, 2 или 3.

3. Соединение по п. 1 или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, –CN или $–OCH_3$;

R_2 представляет собой H, $–CH_3$, $–CH_2CN$, $–CH_2CH_2F$ или $–CH_2CH{=}CH_2$;

R_3 представляет собой H, –CN, $–CH_2OH$, $–C(O)OCH_2CH_3$, $–NO_2$ или пиридинил;

R_4 представляет собой $–CH_2R_{4a}$ или $–CHR_{4a}R_{4b}$;

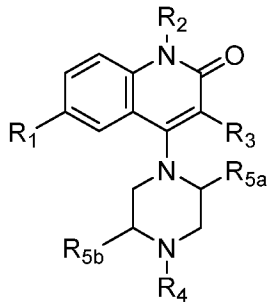
R_{4a} представляет собой фенил, нафталинил или индолил, каждый из которых замещен от нуля до 2 заместителями, независимо выбранными из F, $–CH_3$, $–CH_2CH_3$ и $–OCH_3$;

R_{4b} представляет собой фенил или фторфенил;

каждый R_5 представляет собой $–CH_3$, или два R_5, присоединенных к одному и тому же атому углерода, образуют =O; и

m равно нулю, 1 или 2.

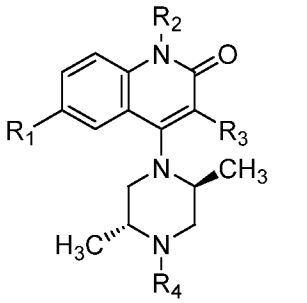
4. Соединение по п. 1 или его соль, имеющее структуру:

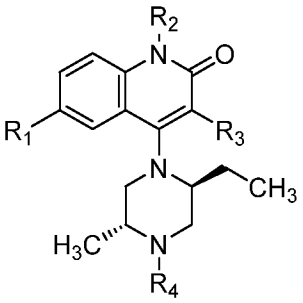


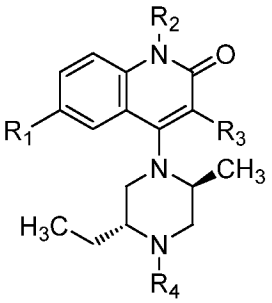
где:

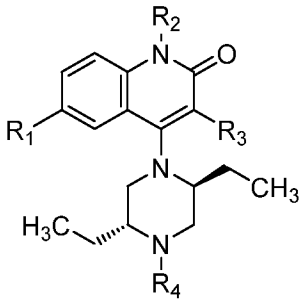
R_{5a} и R_{5b} независимо выбраны из R_5.

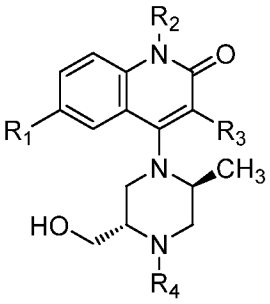
5. Соединение по п. 1 или его соль, имеющее структуру:

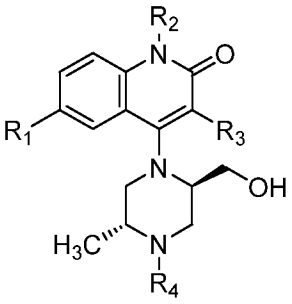


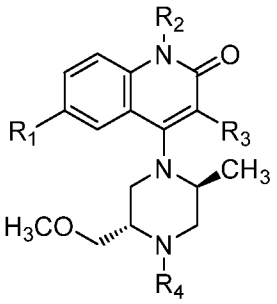












или .

6. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или

$-CH_2CH_2R_{4a}$.

7. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$.

8. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$ или $-CR_{4a}R_{4b}R_{4c}$.

9. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$.

10. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CHR_{4a}R_{4b}$.

11. Соединение по п. 1 или его соль, где указанное соединение представляет собой:

6-фтор-4-{4-[(3-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (1);

6-фтор-4-{4-[(3-фтор-5-метилфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-3-(пиридин-4-ил)-1,2-дигидрохинолин-2-он (2);

4-(4-((1H-индол-4-ил)метил)пиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитрохинолин-2(1H)-он (3);

4-{4-[(1-этил-1H-индол-4-ил)метил]пиперазин-1-ил}-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (4);

4-(4-бензил-3-оксопиперазин-1-ил)-6-фтор-1-метил-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (5);

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил (6);

4-[(2S,5R)-4-[бис(4-фторфенил)метил]-2,5-диметилпиперазин-1-ил]-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-карбонитрил (7);

6-метокси-1-метил-4-{4-[(нафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (8);

4-(4-бензгидрилпиперазин-1-ил)-1-метилхинолин-2(1H)-он (9);

4-[4-(дифенилметил)пиперазин-1-ил]-3-(гидроксиметил)-1-метил-1,2-

дигидрохинолин-2-он (11);

этил 4-{4-[(2-метоксинафталин-1-ил)метил]пиперазин-1-ил}-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат (12);

4-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-3-нитрохинолин-2(1H)-он (13);

4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-1-(2-фторэтил)-3-нитро-1,2-дигидрохинолин-2-он (14);

2-(4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-1-ил)ацетонитрил (15); или

4-{4-[бис(4-фторфенил)метил]пиперазин-1-ил}-3-нитро-1-(проп-2-ен-1-ил)-1,2-дигидрохинолин-2-он (16).

12. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Применение соединения по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака или вирусных инфекций.

14. Применение по п. 13, где указанный рак выбран из рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака легких, рака яичников, рака шейки матки, рака почки, рака головы и шеи, лимфомы, лейкоза и меланомы.

15. Применение соединения по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемой соли для ингибирования активности по меньшей мере одной диацилглицеролкиназы, выбранной из диацилглицеролкиназы альфа (DGKα) и диацилглицеролкиназы дзета (DGKζ).