

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293073 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.23

(51) Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.20

(54) СОЕДИНЕНИЯ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ CDK7

(31) 20382446.1

(32) 2020.05.27

(33) EP

(86) PCT/US2021/033414

(87) WO 2021/242602 2021.12.02

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

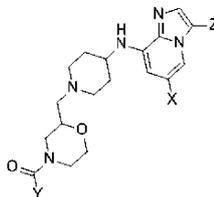
(72) Изобретатель:

Фернандез Фигуэроа Мария Кармен,
Лумерас Амадор Венсеслао, Санчес-
Мартинез Консепсион (US)

(74) Представитель:

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

(57) Предложены ингибиторы CDK7 формулы (I)



где X представляет собой -CH(OH)CH₃, -CHFCH₃, -CF₂CH₃ или -CF₃; Y представляет собой -CH=CH₂ или -C²H=C²H₂ и Z представляет собой -CH(CH₃)₂ или -C²H(CH₃)(CH₂²H), их фармацевтически приемлемые соли, их фармацевтические композиции и способы их применения.

A1

202293073

202293073

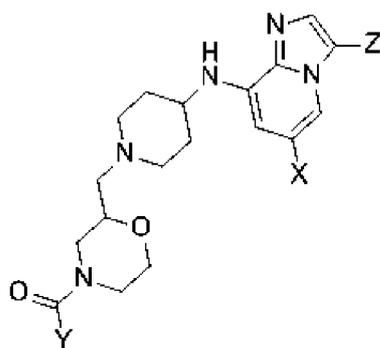
A1

СОЕДИНЕНИЯ, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ CDK7

Циклинзависимые киназы представляют собой крупный класс киназ, играющих важную роль в пролиферации раковых клеток и нарушении регуляции онкогенной транскрипции. CDK7 представляет собой циклинзависимую киназу, которая связывается с циклином H и MAT1 с образованием тримерной циклин-активирующей киназы, которая выполняет свою функцию посредством фосфорилирования других циклин-активирующих киназ, участвующих в контроле клеточного цикла. Указанные комплексы регулируют специфические переходы между двумя последовательными фазами клеточного цикла. CDK7 участвует как во временном регулировании клеточного цикла, так и в транскрипционной активности. CDK7 участвует в процессе инициации транскрипции посредством фосфорилирования субъединицы Rbp1 РНК-полимеразы II. Неконтролируемая пролиферация клеток и нарушение регуляции транскрипции являются отличительными признаками рака. Селективное нацеливание на CDK7 может обеспечивать преимущество благодаря одновременному ингибированию активной транскрипции и прогрессирования клеточного цикла. Таким образом, CDK7 является перспективной мишенью для лечения рака, в частности агрессивного и трудно поддающегося лечению рака.

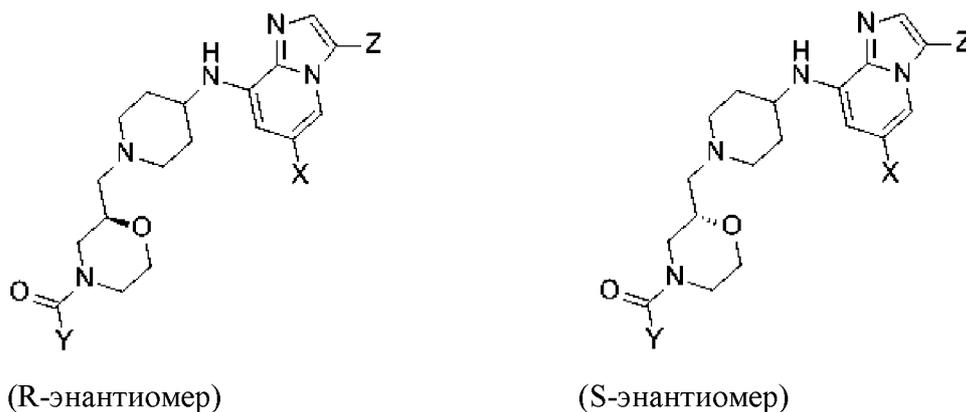
В литературе описаны некоторые низкомолекулярные ингибиторы против CDK7 (см., например, WO 2015/154022, WO 2016/142855, WO 2016/160617, WO 2016/193939 и WO 2017/044858). Однако известные ингибиторы CDK7 могут не быть специфичными в отношении CDK7 и пока не настолько практически пригодны, как это необходимо для эффективного лечения клеточных пролиферативных расстройств, таких как рак. Таким образом, сохраняется потребность в обеспечении новых селективных ингибиторов CDK7 для лечения клеточных пролиферативных расстройств.

В данном документе предложены соединения формулы:



(I)

их фармацевтически приемлемые соли или их фармацевтические композиции. В приведенной формуле X может представлять собой $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CHFCH}_3$, $-\text{CF}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CF}_3$; Y может представлять собой $-\text{CH}=\text{CH}_2$ или $-\text{C}^2\text{H}=\text{C}^2\text{H}_2$; и Z может представлять собой $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ или $-\text{C}^2\text{H}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2^2\text{H})$. Соединения представленной формулы содержат хиральный центр, обеспечивающий R-энантиомерную форму и S-энантиомерную форму, показанные ниже:



В данном документе предложены также R-энантиомер и S-энантиомер, их фармацевтически приемлемые соли или их фармацевтические композиции, где X, Y и Z являются такими, как определено выше.

В данном документе предложены также способы применения соединений указанной формулы, их фармацевтически приемлемых солей и их фармацевтических композиций для лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом. Предложенные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, нуждающемуся в этом. Предложенные способы могут также включать тестирование наличия по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* в биологическом образце, полученном от пациента, и введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемой соли, если тесты образца являются позитивными в отношении указанной мутации с потерей функции. Предложенные способы могут дополнительно или альтернативно включать введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемой соли, при условии,

что биологический образец, полученный от пациента, содержит по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*. Предложенные способы могут дополнительно или альтернативно включать введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемой соли, при условии, что указанный пациент выбран для лечения, если биологический образец, полученный от пациента, является позитивным в отношении по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*.

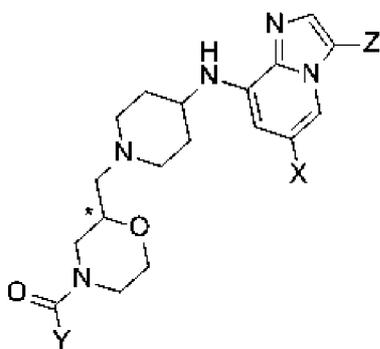
В данном документе предложены также соединения указанной формулы и их фармацевтически приемлемые соли для применения в терапии. В данном документе предложены также соединения указанной формулы и их фармацевтически приемлемые соли для применения для лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом. В качестве дополнительного примера, лечение может включать проведение *in vitro* анализа с использованием биологического образца, полученного от пациента, определяющего присутствие по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и *RBI*, и введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемых солей, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из указанных генов.

В данном документе предложено также применение соединения указанной формулы или его фармацевтически приемлемых солей для производства лекарственного средства для лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом. Такое применение может включать проведение *in vitro* анализа с использованием биологического образца, полученного от пациента, определяющего присутствие по меньшей мере одной инактивирующей мутации в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* и *RBI*, и введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения указанной формулы, включая R- и S-энантиомерные формы, или его фармацевтически приемлемых солей, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из указанных генов.

Описание

В данном документе описаны новые селективные соединения-ингибиторы CDK7. Предложенные новые соединения могут удовлетворять потребность в сильнодействующем, эффективном лечении рака, в частности, рака, обусловленного 5 дерегулированной транскрипцией. Более конкретно, предложенные новые соединения могут удовлетворять потребность в сильнодействующем, эффективном лечении уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, 10 сарком, рака кожи и/или глиом.

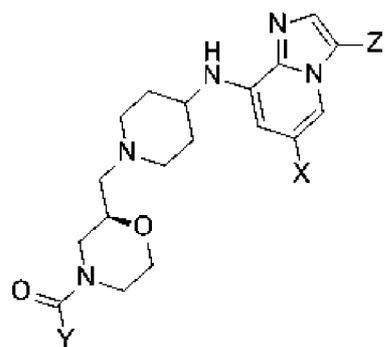
Соединения, описанные в данном документе, представляют собой соединения формулы (I):



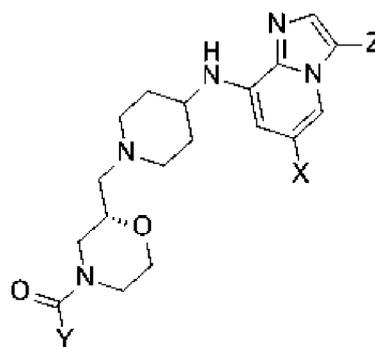
или их фармацевтически приемлемые соли. В формуле (I) X представляет собой – 15 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CHFCH}_3$, $-\text{CF}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CF}_3$; Y представляет собой $-\text{CH}=\text{CH}_2$ или $-\text{C}^2\text{H}=\text{C}^2\text{H}_2$, и Z $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ или $-\text{C}^2\text{H}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2^2\text{H})$. Конкретные примеры формулы (I) включают соединения, в которых X представляет собой $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CHFCH}_3$ или $-\text{CF}_2\text{CH}_3$; Y представляет собой $-\text{CH}=\text{CH}_2$; и Z представляет собой $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

Дополнительные примеры формулы (I) включают соединения, в которых X представляет 20 собой $-\text{CF}_3$; Y представляет собой $-\text{CH}=\text{CH}_2$ или $-\text{C}^2\text{H}=\text{C}^2\text{H}_2$; и Z представляет собой $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ или $-\text{C}^2\text{H}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2^2\text{H})$. Специалистам в данной области техники понятно, что соединения, описанные формулой (I), или их фармацевтически приемлемые соли содержат хиральный центр, положение которого обозначено выше с помощью *.

Специалистам в данной области техники также понятно, что обозначения (R) или (S) 25 хиральных центров по правилу Кана-Ингольда-Прелога варьируется в зависимости от характера заместителей вокруг хирального центра. Хиральный центр в соединении формулы (I) обеспечивает R-энантиомерную форму, представленную формулой (II), и S-энантиомерную формулу, представленную формулой (III):



(II)

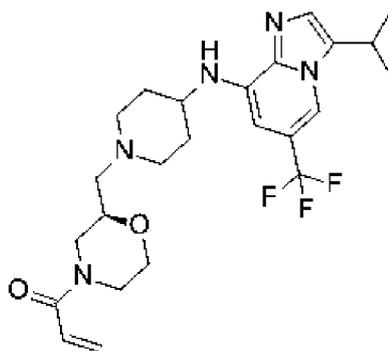


(III)

В данном документе предложены также соединения формулы (II) и формулы (III) или их фармацевтически приемлемые соли, где X, Y и Z являются такими, как определено для формулы (I).

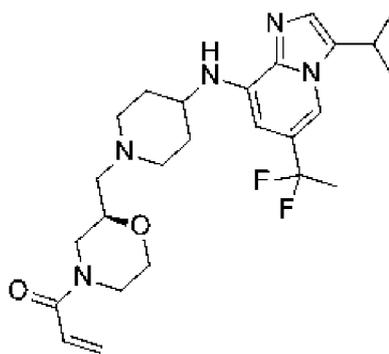
Отдельные энантиомеры могут быть получены, исходя из хиральных реагентов, или посредством технологий стереоселективного или стереоспецифического синтеза. Альтернативно, отдельные энантиомеры могут быть выделены из смесей различных хиральных форм стандартными технологиями хроматографии или кристаллизации в любой удобной точке синтеза соединений формулы (I), формулы (II) и формулы (III). Все отдельные энантиомеры, а также смеси энантиомеров соединений формулы (II) и формулы (III), включая рацематы, считаются включенными в данный документ.

Конкретные примеры соединений формулы (II) (включая номенклатурные названия по ИЮПАК) представлены ниже:

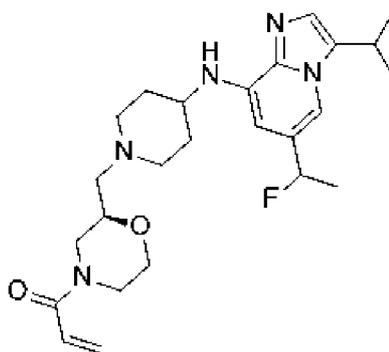


15

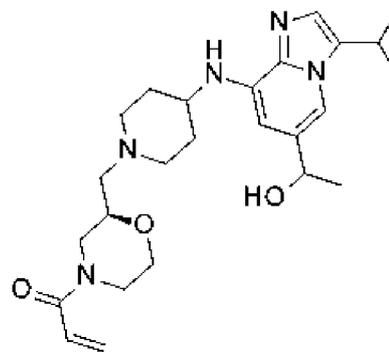
1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-a]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



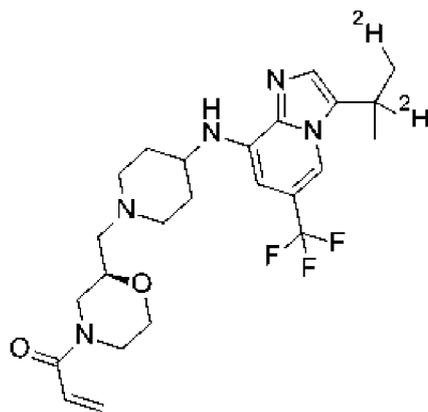
1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



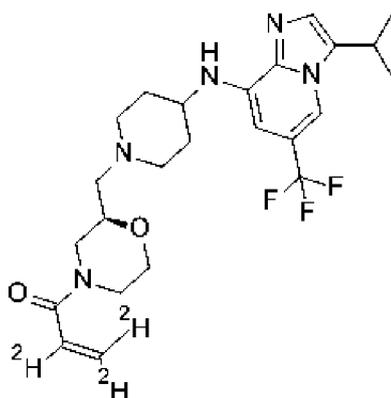
5 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;

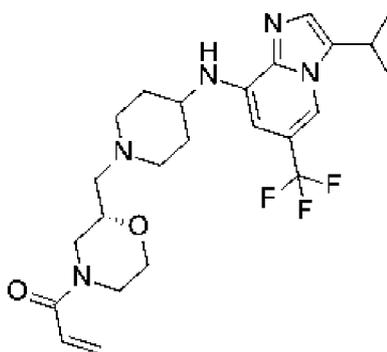


1-[(2R)-2-[[4-[[3-(1,2-дидейтеро-1-метилэтил)-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он; и



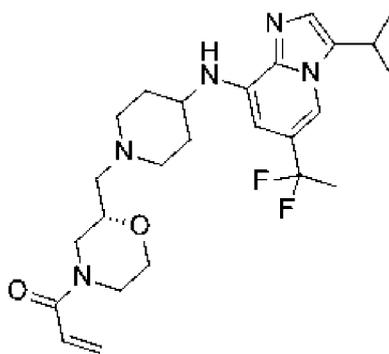
5 2,3,3-тридейтеро-1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он.

Конкретные примеры соединений формулы (III) (включая номенклатурные названия по ИЮПАК) представлены ниже:

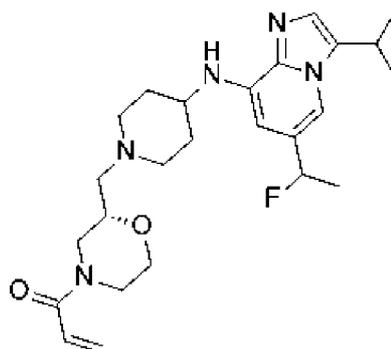


10

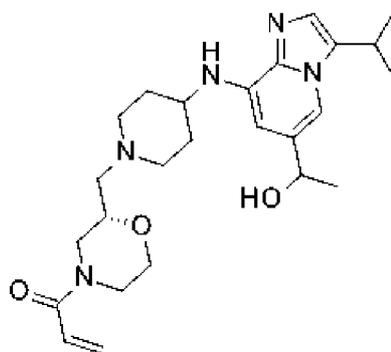
1-[(2S)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



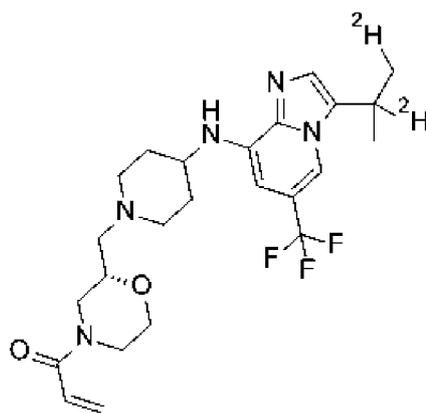
1-[(2S)-2-[[4-[[6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



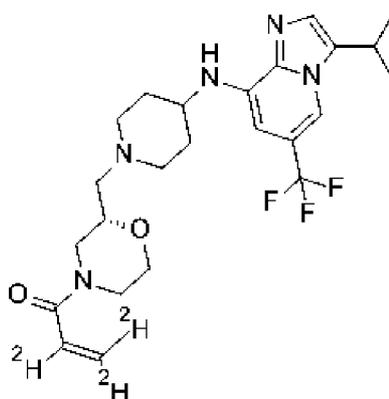
5 1-[(2S)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



1-[(2S)-2-[[4-[[6-(1-гидрокси)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он;



1-[(2S)-2-[[4-[[3-(1,2-дидейтеро-1-метилэтил)-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он; и



5 2,3,3-тридейтеро-1-[(2S)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он.

В данном документе специально описаны несколько дейтерированных молекул, например, соединения формулы (I), где Y представляет собой $-C^2H=C^2H_2$, и где Z представляет собой $-C^2H(CH_3)(CH_2^2H)$. Возможны другие дейтерированные молекулы, и они считаются описанными в данном документе, если в описанной молекуле атом водорода может быть заменен на дейтерий.

Соединения, описанные в данном документе, могут вступать в реакции с образованием фармацевтически приемлемых солей, и фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I), формулы (II) и формулы (III), а также конкретных примеров соединений формулы (I), формулы (II) и формулы (III) считаются включенными в данное описание. Фармацевтически приемлемые соли и общие способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, P. Stahl, *et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, 2^е пересмотренное издание (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, том 66, № 1, январь, 1977). Конкретные примеры подходящих фармацевтически приемлемых

солей включают гидроклоридные соли и сульфатные соли, на данный перечень не является исключительным.

Соединения, описанные в данном документе, обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, суточные дозы входят в диапазон от около 1 мг до около 2 г.

5 Следует понимать, что фактически вводимое количество соединения определяет врач с учетом релевантных обстоятельств, включая патологическое состояние, подлежащее лечению, выбранный способ введения, фактически вводимое соединение или соединения, возраст, массу и реакцию конкретного пациента, а также тяжесть симптомов пациента.

10 Соединения, описанные в данном документе, могут быть составлены в фармацевтические композиции, которые можно вводить различными способами. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennago, *et al.*, ред., 21е изд., Mack Publishing Co., 2005)). В частности, соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном документе, или их
15 фармацевтически приемлемые соли, можно комбинировать с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Более конкретно, соединения, описанные в данном документе формулой (I), формулой (II) и формулой (III), могут быть составлены в фармацевтические композиции. Кроме того, соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном
20 документе, или их фармацевтически приемлемые соли, можно комбинировать с одним или более другими терапевтическими агентами. Например, соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть компонентом фармацевтической композиции для лечения рака в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями,
25 разбавителями или вспомогательными веществами и необязательно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Фармацевтические композиции, содержащие соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли, могут быть использованы в способах, описанных в данном документе.

30 Термин «лечение» (или «лечить», или «обеспечение лечения»), используемый в данном документе, относится к ограничению, замедлению, остановке или реверсированию прогрессирования или тяжести существующего симптома, патологического состояния или расстройства.

35 В данном контексте термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние пациента, которое обычно характеризуется нерегулируемым

клеточным ростом. В данное определение включены доброкачественные и злокачественные раковые заболевания. «Рак на ранней стадии» или «опухоль на ранней стадии» означает рак, который не является распространенным или метастатическим, или классифицируется как рак 0, I или II стадии. Примеры рака включают, но не ограничиваясь ими, уротелиальный рак, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак желудка, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак предстательной железы, гематологические раковые заболевания, саркомы, рак кожи или глиомы.

Предложены способы лечения рака, в частности, лечения рака с дерегулированной транскрипцией с применением соединений формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанных в данном документе. Один из таких способов включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе. Типы рака, которые можно лечить с применением композиций, описанных в данном документе, включают уротелиальный рак, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак желудка, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак предстательной железы, гематологические раковые заболевания, саркомы, рак кожи или глиомы. Более конкретно, типы рака могут представлять собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. В частности, рак может представлять собой рак молочной железы. Указанные типы рака могут быть связаны с мутацией с потерей функции в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*. Таким образом, мутация с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* может указывать на необходимость лечения. Мутация с потерей функции в одном или более из генов *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* может указывать на то, что подходящим может быть лечение одним или более способами, описанными в данном документе.

Другой способ лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом у пациента включает тестирование на наличие по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI* в биологическом образце, полученном от пациента, и введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, если тесты биологического образца являются

позитивными в отношении по меньшей мере одной мутации с потерей функции в любом из генов *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RB1*.

Дополнительный способ лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом у пациента включает введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, при условии, что биологический образец, полученный от пациента, содержит по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RB1*.

Дополнительный способ лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом у пациента включает введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, при условии, что пациент выбран для лечения, если биологический образец, полученный от пациента, является позитивным в отношении по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RB1*.

В способах, описанных в данном документе, биологический образец может представлять собой образец опухоли. После получения биологического образца можно анализировать образец способами, известными специалистам в данной области техники, таким как геномное/ДНК секвенирование. В предложенных способах образец может быть получен от пациента до первого введения соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли, также предназначены для применения в терапии и, в частности, для лечения рака с deregulated транскрипцией. Как отмечено в данном документе, раковые заболевания с deregulated транскрипцией включают уротелиальный рак, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак желудка, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак предстательной

железы, гематологические раковые заболевания, саркомы, рак кожи или глиомы. Более конкретно, типы рака могут представлять собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. В частности, рак может представлять собой рак молочной железы. Соединение формулы (I), формулы (II) или формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить пациенту, имеющему по меньшей мере одну инактивирующую мутацию в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*, обнаруженную при осуществлении *in vitro* анализа с использованием биологического образца, полученного от пациента. Биологический образец может представлять собой образец опухоли, и образец опухоли можно анализировать способами, известными специалистам в данной области техники, таким как геномное/ДНК секвенирование. Кроме того, образец может быть получен от пациента до первого введения соединения формулы (I), (II) или (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей. Применение соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей в терапии может основываться на пациенте, выбранном для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*. При использовании в терапии, соединение формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли можно вводить пациенту в дозе от около 1 мг до 2 г.

Соединение формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанные в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли, могут быть использованы для производства лекарственного средства для лечения рака. Раковые заболевания, которые можно лечить с применением лекарственного средства, описанного в данном документе, включают уротелиальный рак, рак матки, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак желудка, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак предстательной железы, гематологические раковые заболевания, саркомы, рак кожи или глиомы. Более конкретно, типы рака могут представлять собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка. В частности, рак может представлять собой рак молочной железы. Применение соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей для производства лекарственного средства также может включать стадию проведения *in vitro* анализа с использованием биологического образца, полученного от пациента, определяющего наличие по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*, и введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы (II) или

формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей, если присутствует по меньшей мере одна инактивирующая мутация в любом из указанных генов. В таких способах применения биологический образец может представлять собой образец опухоли, и образец опухоли можно анализировать способами, известными специалистам в данной области техники, таким как геномное/ДНК секвенирование. Кроме того, в таких способах применения образец может быть получен от пациента до первого введения соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей. В таких способах применение соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей в терапии может основываться на пациенте, выбранном для лечения по наличию по меньшей мере одной инактивирующей мутации в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*. Кроме того, в таких способах применения соединение формулы (I), формулы (II) или формулы (III), описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли можно вводить пациенту в дозе от около 1 мг до 2 г.

Соединения формулы (I), формулы (II) и формулы (III) или их фармацевтически приемлемые соли могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, а также описанными ниже в способах получения и примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно различным образом комбинировать или сочетать со стадиями из других схем для получения соединений формулы (I), формулы (II) и формулы (III) или их фармацевтически приемлемых солей. Продукты каждой стадии на представленных ниже схемах можно выделять обычными способами, известными в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. Реагенты и исходные материалы без труда доступны для специалистов в данной области техники.

Отдельные изомеры и энантиомеры могут быть выделены или разделены специалистом в данной области техники на любой удобной точке синтеза соединений, описанных в данном документе, например, такими методами как технологии селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., “*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*”, John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, Wiley-Interscience, 1994).

Промежуточные соединения и способы, подходящие для синтеза соединений, описанных формулой (I), формулой (II) и формулой (III), считаются включенными в данное описание.

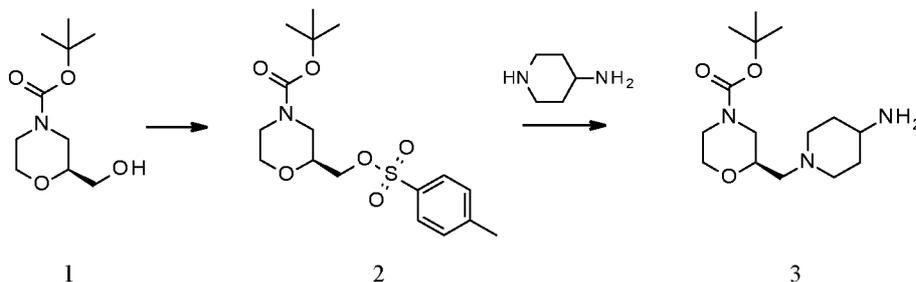
Кроме того, некоторые промежуточные соединения, описанные в данном документе, могут содержать одну или более защитных групп. Переменная защитная группа может быть в каждом случае одинаковой или различной, в зависимости от конкретных условий реакции и от конкретных осуществляемых преобразований. Условия введения и удаления защитных групп известны специалистам в данной области техники и описаны в литературе (см., например, “*Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*”, четвертое издание, Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Следующие способы получения и примеры представлены для иллюстрации способов и соединений, описанных в данном документе.

Способы получения и примеры

Ниже приведено определение некоторых сокращений: «¹H ЯМР» относится к ¹H ядерному магнитному резонансу; «экв.» относится к эквиваленту»; «ТГФ» относится к тетрагидрофурану; «ДХМ» относится к дихлорметану; «NCS» относится к N-хлорсукцинимиду; «NIS» относится к N-иодсукцинимиду; «ИПС» относится к изопропиловому спирту; «ACN» относится к ацетонитрилу; «DIPEA» относится к N,N-диизопропилэтиламину; «DMCO» относится к диметилсульфоксиду; «EtOH» относится к этанолу; «MTБЭ» относится к метил-*трет*-бутиловому эфиру; «ТЭА» относится к триэтиламину; «2-МеТГФ» относится к 2-метилтетрагидрофурану; «MeOH» относится к метанолу; «УФ» относится к ультрафиолету; «ОФ-ЖХ/МС» относится к обращенно-фазовой жидкостной хроматомасс-спектрометрии; «ЭР/МС» относится к электрораспылительной масс-спектрометрии; «DMEA» относится к диметилэтаноламину; «DMAP» относится к диметиламинопиридину; «EtOAc» относится к этилацетату; «DMФА» относится к N,N-диметилформамиду; «ТФК» относится к трифторуксусной кислоте; «SCX» относится к сильному катионному обмену; «э.и.» относится к энантиомерному избытку; «мин» относится к минутам; «ч.» относится к часам; «АТФ» относится к аденозинтрифосфату; «ДТТ» относится к дитиотреитолу; «HEPES» относится к (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте); «ЭДТК» относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; «АТСС» относится к Американской коллекции типовых культур; «комн. т-ра» относится к комнатной температуре; «Rt» относится к времени удерживания; «PBS» относится к фосфатно-солевому буферному раствору; «BSA» относится к альбумину бычьей сыворотки; «FBS» относится к эмбриональной бычьей сыворотке; «РНКаза» относится к рибонуклеазе; и «His» относится к гистидину.

Схема 1

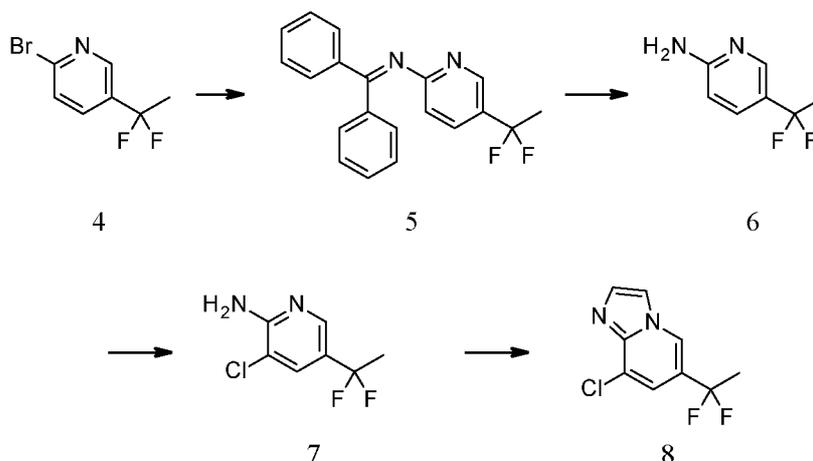


5

На схеме 1 показан синтез соединения 3. Доступный в продаже хиральный гидроксиметилморфолин 1 может быть превращен в *p*-толуолсульфонат 2 с помощью соответствующего основания. Затем сульфонат 2 может быть вытеснен посредством нуклеофильного замещения доступным в продаже 4-аминопиперидином с получением хирального N-защищенного морфолинопиперидинового первичного амина 3.

10

Схема 2



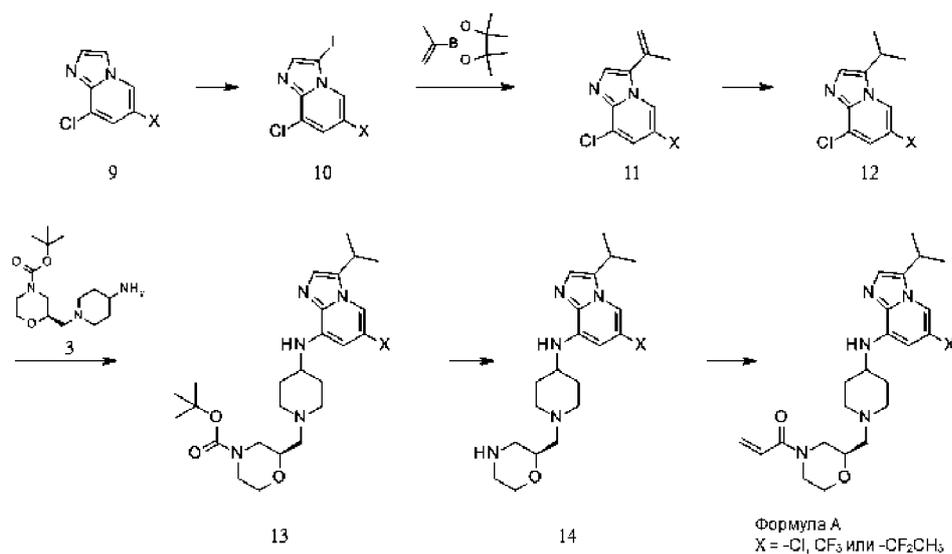
15

На схеме 2 показан синтез соединения 8. Пиридилметанимин 5 может быть синтезирован посредством обработки доступного в продаже дифторэтилпиридина 4 дифенилметанимином в условиях сочетания на металлическом катализаторе (например, Pd), хорошо известных в данной области техники. Защитная группа имида 5 может быть удалена в кислотных условиях с получением 2-аминопиридина 6. Региоселективное присоединение хлора может быть выполнено с использованием соответствующего хлорирующего агента с получением хлорпиридина 7. Синтез имидазопиридина 8 из 2-аминопиридина 7 может быть проведен в различных условиях, известных специалистам в

20

данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, циклоконденсацию, перегруппировку и окислительную циклизацию.

Схема 3

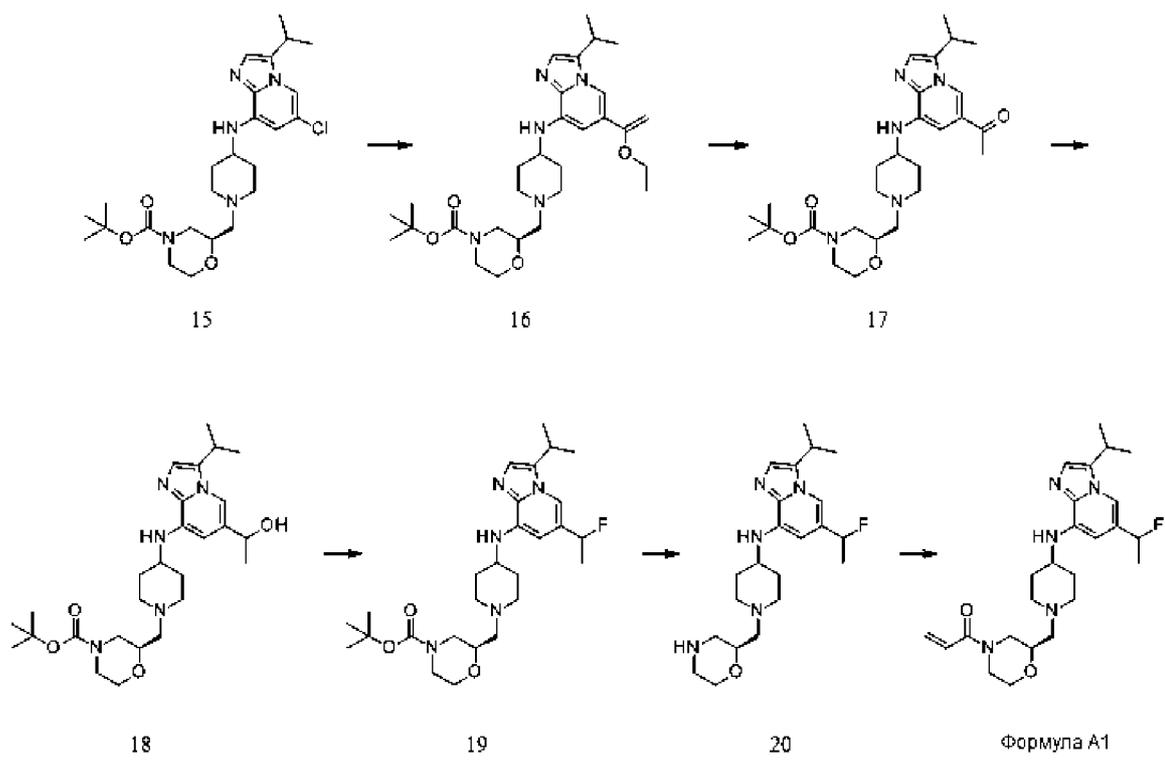


5

На схеме 3 показан синтез соединений формулы А. Иодирование имидазопиридина 9 может быть достигнуто посредством обработки соответствующим иодсодержащим реагентом (например, NIS, I₂) с получением 3-иодимидазопиридина 10. Последующее связывание 3-иодимидазопиридина 10 может быть достигнуто в различных условиях, известных специалистам в данной области техники, включая реакции на металлическом катализаторе (например, Pd, Ni), с получением изопрпенилимидазопиридина 11. Изопрпенилимидазопиридин 12 может быть синтезирован из изопрпенилимидазопиридина 11 с использованием восстановительных условий, включая, но не ограничиваясь ими, Pd/C в атмосфере газообразного H₂. Арилхлорид соединения 12 может быть вытеснен 4-аминопиперидином 3 с получением аминоимидазопиридина 13. Удаление защитной группы из N-защищенного морфолина 13 может быть достигнуто посредством обработки соответствующей сильной кислотой с получением вторичного амина 14. Акриламид формулы А может быть получен посредством обработки вторичного амина 14 основанием и соответствующим хлорангидридом кислоты.

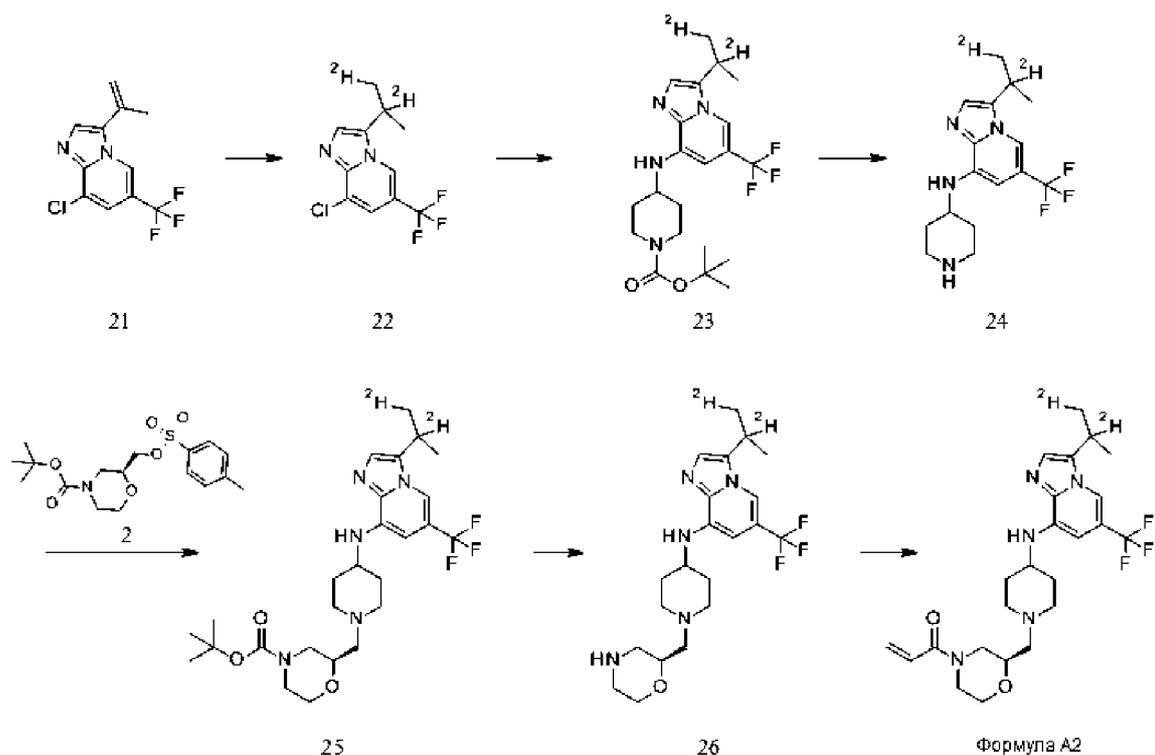
20

Схема 4



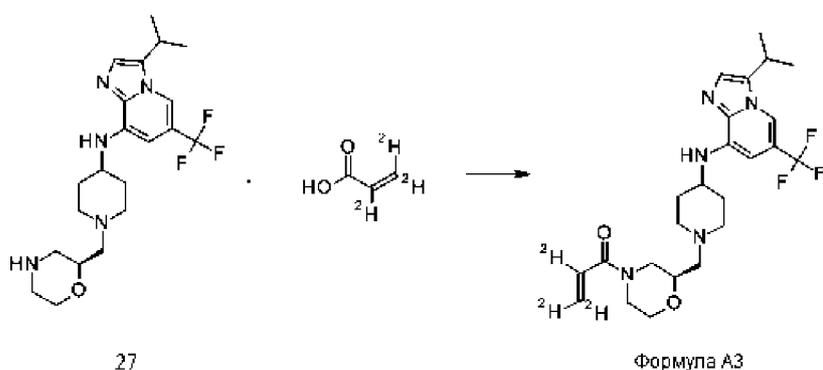
На схеме 4 показан синтез соединений формулы А1. Гетероарил-енольный простой эфир 16 может быть синтезирован из гетероарилхлорида 15 с использованием соответствующего реагента олова и катализа на металле. Обработка простого енольного эфира 16 водным раствором соответствующей сильной кислоты приводит к получению гетероарилкетона 17. Последующее восстановление до вторичного спирта 18 может быть осуществлено с использованием ряда восстановительных агентов, таких как гидрид металла, боргидридная соль и диборан, в полярном апротонном растворителе. Вторичный спирт 18 может быть преобразован в бензилфторид 19 с использованием соответствующего фторирующего реагента, такого как DAST, Deoxofluor или XtalFluor. Затем соединение формулы А1 может быть получено по существу так, как описано на схеме 3.

Схема 5

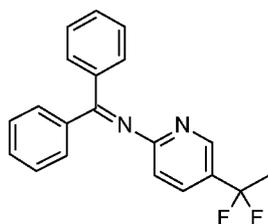


На схеме 5 показан синтез соединений формулы А2. Дейтерированный изопропилимидазопиридин 22 может быть получен из изопропенилимидазопиридина 21 с использованием катализа на переходном металле в атмосфере дейтерия под давлением при повышенной температуре. Гетероарилхлорид 22 может быть замещен посредством нуклеофильного замещения N-защищенным 4-аминопиперидином по существу так, как описано на схеме 3, и с последующим удалением защитной группы с получением вторичного амина с использованием соответствующей сильной кислоты. Пиперидин 24 может быть замещен N-защищенным морфолиносulfонатом 2 по существу так, как описано на схеме 1, и использован для получения соединения формулы А2 по существу так, как описано на схеме 3.

Схема 6



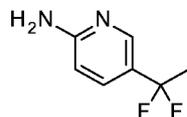
На схеме 6 показан синтез формулы А3, который может быть осуществлен по существу так, как описано на схеме 3.



Добавляли дифенилметанимин (9,5 г, 52 ммоль), (рац)-2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил (4,2 г, 6,5 ммоль) и Cs₂CO₃ (18,5 г, 57 ммоль) к раствору 2-бром-5-(1,1-дифторэтил)пиридина (10 г, 44 ммоль) в толуоле (175 мл). Добавляли ацетат палладия (II) (0,98 г, 4,4 ммоль), продували N₂ и нагревали при 100 °С. Через 16 часов фильтровали через слой диатомовой земли и промывали EtOAc (400 мл). Удаляли растворитель при пониженном давлении с получением коричневого маслянистого вещества. Очищали остаток колоночной хроматографией, элюируя смесью EtAOc:гексаны (градиент 0-30%). Объединяли соответствующие фракции и концентрировали при пониженном давлении с получением N-[5-(1,1-дифторэтил)-2-пиридил]-1,1-дифенилметанимина. После описанного подготовительного синтеза получали 8,2 г (выход 49%) в виде желтого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 323 (M+H).

Подготовительный синтез 2

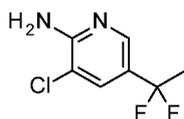
5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амин



Добавляли HCl (5 M в ИПС, 13 мл, 67 ммоль) к раствору N-[5-(1,1-дифторэтил)-2-пиридил]-1,1-дифенилметанимина (8,6 г, 27 ммоль) в ДХМ (134 мл) и MeOH (134 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Выпаривали растворитель и обрабатывали остаток ультразвуком со смесью гексаны/МТБЭ (9:1) (50 мл). Декантировали твердое вещество и промывали дополнительным количеством смеси растворителей (2 x 50 мл). Твердое вещество обрабатывали 2 н. раствором NH₃ в MeOH (40 мл). Выпаривали растворители при пониженном давлении с получением 5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амина. После описанного подготовительного синтеза получали 4,77 г (выход 96%) в виде маслянистого белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 159 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 8,10 (дд, J= 0,9, 2,3 Гц, 1H), 7,54-7,49 (м, 1H), 6,47 (дд, J= 0,6, 8,7 Гц, 1H), 6,31 (шс, 2H), 1,93 (т, J= 18 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 3

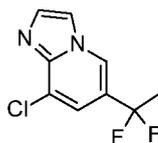
3-хлор-5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амин



По частям, в течение 20 минут добавляли NCS (1,3 г, 9,8 ммоль) к раствору 5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амина (1,5 г, 6,5 ммоль) в ACN (26 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении и очищали остаток на колонке SCX (50 г): 2 объема MeOH. Неочищенный материал растворяли в ДХМ (5 x 3 мл) и загружали в колонку. Промывали сначала ДХМ, затем MeOH и элюировали 7 М раствором NH₃ в MeOH (250 мл). Выпаривали основную фракцию с получением 3-хлор-5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амина. После описанного подготовительного синтеза получали 1,17 г (выход 84%) в виде темно-коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 193/195. ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 8,12-8,11 (м, 1H), 7,76 (д, J= 2,1 Гц, 1H), 6,72 (с, 2H), 1,96 (т, J= 18 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 4

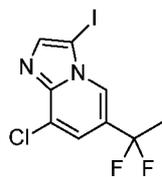
8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)имидазо[1,2-а]пиридин



Раствор 3-хлор-5-(1,1-дифторэтил)пиридин-2-амина (4,5 г, 19 ммоль) в EtOH (95 мл) обрабатывали 2-хлорацетальдегидом (55% мас., 8,9 мл, 76 ммоль). Кипятили реакционную смесь с обратным холодильником в течение 2,5 часа. Выпаривали EtOH и обрабатывали остаток насыщенным водным раствором NaHCO₃, и экстрагировали ДХМ (2 x 80 мл). Сушили органическую фазу над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением темно-коричневого маслянистого вещества. Очищали остаток колоночной хроматографией, элюируя смесью EtAOc:гексаны (градиент 0-60%). Объединяли соответствующие фракции и концентрировали при пониженном давлении с получением 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)имидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 1,48 г (выход 36%) в виде коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 217/219. ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 8,95 (к, J= 1,5 Гц, 1H), 8,15 (д, J= 1,3 Гц, 1H), 7,72 (д, J= 1,3 Гц, 1H), 7,64 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 2,06 (т, J= 19 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 5

8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-иодимидазо[1,2-а]пиридин

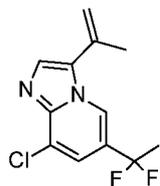


Добавляли NIS (1,7 г, 7,4 ммоль) к раствору 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)имидазо[1,2-
 а]пиридина (1,48 г, 6,7 ммоль) в ACN (34 мл) и перемешивали при комнатной температуре
 в течение 16 часов. Выпаривали все летучие вещества, растворяли неочищенный материал
 5 в 2-МеТГФ (350 мл), промывали 1 М раствором Na₂S₂O₃ (1 x 50 мл) и насыщенным
 водным раствором NaHCO₃ (3 x 50 мл). Сушили органический слой над безводным
 Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали с получением коричневого маслянистого
 вещества. Очищали остаток колоночной хроматографией, элюируя смесью EtAOc:гексаны
 10 (градиент 0-35%). Объединяли соответствующие фракции и концентрировали при
 пониженном давлении с получением 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-иодимидазо[1,2-
 а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 1,9 г (выход 81%) в
 виде светло-коричневого твердого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 343/345. ¹H ЯМР
 (400,13 МГц, ДМСО): 8,36 (к, J= 1,5 Гц, 1H), 7,89 (с, 1H), 7,78 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 2,11 (т, J=
 19 Гц, 3H).

15

Подготовительный синтез 6

8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин

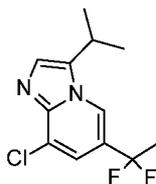


Растворяли 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-иодимидазо[1,2-а]пиридин (2,2 г, 6,4 ммоль)
 20 в EtOH (43 мл). Добавляли 1,2 М раствор K₂CO₃ в воде (16 мл, 19,3 ммоль) в атмосфере N₂.
 Продували N₂ в течение 5 минут с помощью выпускной иглы. Добавляли 2-изопропенил-
 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (1,25 г, 7,1 ммоль) и BrettPhos Pd G3 (0,3 г, 0,32
 ммоль). Снова продували N₂ в течение 5 минут и перемешивали при комнатной
 температуре в течение 20 часов. Удаляли летучие вещества и разделяли остаток между 2-
 25 МеТГФ (22 мл) и водой (11 мл). Дополнительно экстрагировали водный слой 2-МеТГФ (22
 мл), сушили органические слои над безводным Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали все
 летучие вещества с получением коричневого маслянистого вещества. Очищали остаток
 колоночной хроматографией, элюируя смесью EtAOc:гексаны (градиент 0-40%).
 Объединяли соответствующие фракции и концентрировали при пониженном давлении с

получением 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 1,49 г (выход 90%) в виде светло-коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 257/259. ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 8,61 (к, J= 1,5 Гц, 1H), 7,86 (с, 1H), 7,70 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 5,51 (с, 1H), 5,47 (дд, J= 0,7, 1,4 Гц, 1H), 2,09 (т, J= 19 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 7

8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин



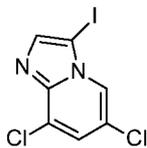
10 Растворяли 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин (1,49 г, 5,80 ммоль) в MeOH (41 мл). Добавляли платину (типа 128M, 5,34% Pt (в пересчете на сухую массу) с влажностью 58%, 1,06 г, 0,12 ммоль) в атмосфере N₂. Перемешивали в атмосфере H₂ (из баллона) в течение 80 минут. Фильтровали через слой диатомовой земли, элюируя смесью 1:1 MeOH/EtOH (100 мл). Удаляли все летучие вещества при

15 пониженном давлении с получением 8-хлор-6-(1,1-дифторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 1,47 г (выход 91%) в виде светло-желтого маслянистого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 259/261. ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 8,52 (к, J= 1,5 Гц, 1H), 7,61 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 7,56 (д, J= 0,7 Гц, 1H), 2,10 (т, J= 19 Гц, 3H), 1,33 (д, J= 6,8 Гц, 6H).

20

Подготовительный синтез 8

6,8-дихлор-3-иодимидазо[1,2-а]пиридин



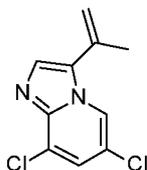
25 Добавляли NIS (70,3 г, 306 ммоль) к раствору 6,8-дихлоримидазо[1,2-а]пиридина (52,1 г, 278,5 ммоль) в ACN (1,4 л) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 часов. Фильтровали суспензию и промывали твердое вещество ACN. Сушили под потоком воздуха с получением 6,8-дихлор-3-иодимидазо[1,2-а]пиридина (54,4 г, выход 62%) в виде бледно-коричневого твердого вещества. Выпаривали маточный раствор при

30 пониженном давлении. Растворяли неочищенное вещество в 2-МеТГФ (520 мл),

промывали раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (25% мас./об.) (520 мл) и раствором NaHCO_3 (9% мас./об.) (520 мл). Отделяли органическую фазу, сушили над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением 6,8-дихлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 30,4 г (выход 35%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 312/314. ^1H ЯМР (400,21 МГц, CDCl_3): 8,17 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,38 (д, $J=1,7$ Гц, 1H).

Подготовительный синтез 9

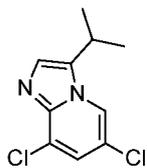
6,8-дихлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин



В трубку для работы при высоком давлении добавляли 6,8-дихлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин (54,9 г, 175,7 ммоль), 1,4-диоксан (1,1 л) и 1,2 М раствор K_2CO_3 в воде (440 мл, 527 ммоль). Продували смесь потоком N_2 (три раза), добавляли 2-изопропенил-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (34,2 г, 193 ммоль), Brettphos Pd G3 (4,06 г, 4,39 ммоль) и снова продували (3х). Закрывали трубку и нагревали смесь при 50 °С в течение 26 часов. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении. Суспендировали остаток в 2-МеТГФ (550 мл) и воде (275 мл). Отделяли органическую фазу, сушили над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Очищали остаток флэш-хроматографией, элюируя смесью EtAOc:гексаны (градиент 0-40%). Объединяли соответствующие фракции и концентрировали при пониженном давлении с получением 6,8-дихлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 36,4 г (выход 87%) в виде желтого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 227/229.

Подготовительный синтез 10

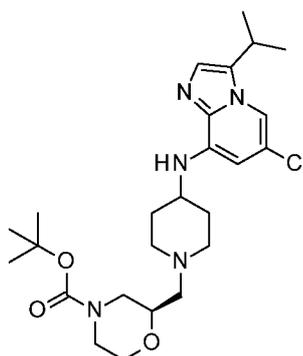
6,8-дихлор-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин



Перемешивали раствор 6,8-дихлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридина (23,6 г, 98,7 ммоль), платины (18,1 г, 2,0 ммоль) и MeOH (592 мл) при комнатной температуре в атмосфере H₂ в течение 7 часов. Фильтровали смесь через слой диатомовой земли, промывали MeOH и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал
5 растирали с 288 мл воды в течение ночи. Фильтровали при пониженном давлении через воронку со спеченным фильтром (размер пор 3 Å). Сушили под потоком воздуха и под высоким вакуумом в течение ночи с получением 6,8-дихлор-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 14,9 г (выход 63%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 229/231. ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 7,94 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 7,50 (д, J= 0,6 Гц, 1H), 7,27 (д, J= 1,8 Гц, 1H), 3,19-3,12 (м,
10 1H), 1,42 (д, J= 6,8 Гц, 6H).

Подготовительный синтез 11

15 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-хлор-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат

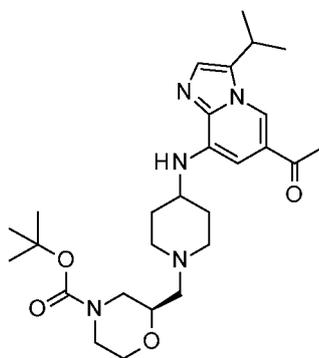


В пробирку для работы при высоком давлении добавляли 6,8-дихлор-3-
20 изопропилимидазо[1,2-а]пиридин (1,0 г, 4,17 ммоль), *трет*-бутил-(2R)-2-[(4-амино-1-пиперидил)метил]морфолин-4-карбоксилат (1,9 г, 6,25 ммоль), *трет*-бутоксид натрия (1,24 г, 12,5 ммоль) и 1,4-диоксан (21 мл). Через раствор барботировали N₂ и добавляли BrettPhos Pd G3 (0,24 г, 0,25 ммоль). Закрывали пробирку и нагревали реакционную смесь при 100 °C в атмосфере N₂ в течение 22 часов. Охлаждали реакционную смесь до
25 комнатной температуры, разбавляли МТБЭ и промывали водой. Отделяли органическую фазу и экстрагировали водную фазу МТБЭ (дважды). Объединяли органические слои, сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный материал флэш-хроматографией, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-3%). Соответствующие фракции концентрировали при пониженном давлении и сушили
30 под высоким вакуумом с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-хлор-3-

изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 1,37 г (выход 66%) в виде зеленоватой пены. ЭР/МС (m/z): 492 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 7,74 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 7,22 (с, 1H), 6,14 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 5,94 (д, J= 8,3 Гц, 1H), 3,86-3,68 (м, 3H), 3,49-3,41 (м, 3H), 3,26-3,20 (м, 1H), 2,87-2,79 (м, 3H), 2,40-2,31 (м, 2H), 2,23-2,10 (м, 2H), 1,90-1,87 (м, 2H), 1,62-1,50 (м, 2H), 1,41 (с, 9H), 1,28 (д, J= 6,8 Гц, 6H).

Подготовительный синтез 12

10 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-ацетил-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат

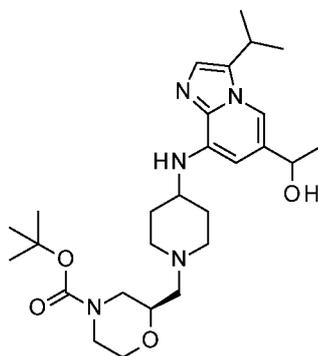


Добавляли трибутил(1-этоксивинил)станнан (0,86 мл, 2,5 ммоль), CsF (0,59 г, 3,9 ммоль) и XPhos-Pd G2 (0,15 г, 0,19 ммоль) к раствору *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-хлор-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (1,0 г, 1,9 ммоль) в толуоле (10 мл)). Продували раствор N₂ и перемешивали при 95 °С в течение 4 часов. Охлаждали до комнатной температуры, фильтровали смесь через слой диатомовой земли, промывали EtOAc и концентрировали при пониженном давлении. Снова растворяли остаток в 2-пропаноле (19 мл). Добавляли HCl (0,2 М в воде) (19 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 5,5 часа. Нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Добавляли EtOAc и перемешивали в течение 10 минут. Отделяли органический слой и экстрагировали водную фазу дополнительным количеством EtOAc. Объединяли органические слои, сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный материал на силикагеле, элюируя сначала смесью ДХМ:гексаны (50%, изократическая), а затем смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-3%). Концентрировали при пониженном давлении, сушили под высоким вакуумом с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-ацетил-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 0,76 г (выход 68%)

в виде желтого пенистого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 500 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 8,04 (д, J= 1,4 Гц, 1H), 7,30 (д, J= 0,7 Гц, 1H), 6,60 (д, J= 1,1 Гц, 1H), 5,22-5,16 (м, 1H), 4,01-4,00 (м, 3H), 3,63-3,58 (м, 3H), 3,26-3,20 (м, 1H), 2,97-2,89 (м, 3H), 2,62 (с, 5H), 2,41-2,34 (м, 3H), 2,19-2,11 (м, 2H), 1,82-1,80 (м, 2H), 1,49 (с, 9H), 1,44 (д, J= 6,9 Гц, 6H).

Подготовительный синтез 13

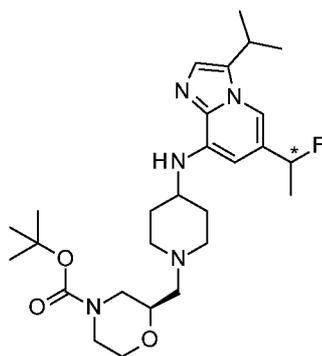
Рац-*трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



Охлаждали до 0 °С раствор *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-ацетил-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (460 мг, 0,79 ммоль) в MeOH (4 мл) в атмосфере N₂. По частям добавляли NaBH₄ (0,04 г, 0,9 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 15 минут. Разбавляли MeOH и медленно добавляли воду. Удаляли органический растворитель при пониженном давлении. Остаток разбавляли EtOAc и промывали водой. Объединяли органические слои, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения. После описанного подготовительного синтеза получали 0,4 г (выход 88%) в виде бледно-коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 502 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, CDCl₃): 7,38 (с, 1H), 7,22 (д, J= 0,7 Гц, 1H), 6,09 (д, J= 0,7 Гц, 1H), 5,12 (д, J= 7,9 Гц, 1H), 4,89 (к, J= 6,4 Гц, 1H), 3,97-3,86 (м, 3H), 3,60-3,50 (м, 3H), 3,19-3,12 (м, 1H), 2,94 (д, J= 9,5 Гц, 3H), 2,72-2,56 (м, 2H), 2,37-2,25 (м, 3H), 2,13-2,10 (м, 2H), 1,74-1,64 (м, 4H), 1,57 (д, J= 6,4 Гц, 3H), 1,49 (с, 9H), 1,39 (д, J= 6,8 Гц, 3H).

Подготовительный синтез 14

Рац-*трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-[1-фторэтил]-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



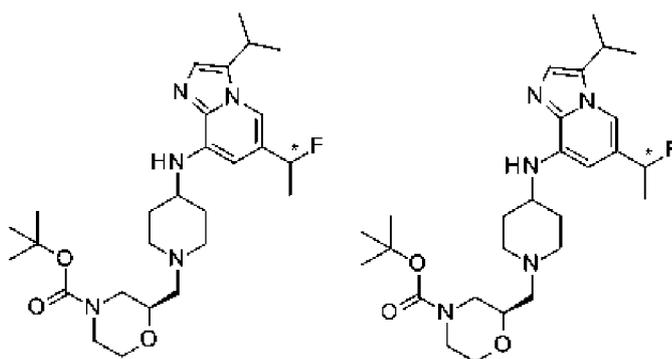
В тефлоновую пробирку загружали *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-
 5 изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-
 карбоксилат (406 мг, 0,7 ммоль) и ДХМ (2,3 мл) в атмосфере N₂ и охлаждали до -78 °С.
 Последовательно добавляли ТЭА (0,1 мл, 0,7 ммоль), тригидрофторид триметиламина (0,2
 мл, 1,4 ммоль) и Xtalfluoro-E (279 мг, 1,1 ммоль). Перемешивали смесь при -78 °С в
 течение 30 минут и затем оставляли нагреваться до комнатной температуры, и
 10 перемешивали в течение 20 часов. Охлаждали смесь на льду и гасили, медленно добавляя
 насыщенный водный раствор NaHCO₃, воду и ДХМ. Дополнительно экстрагировали
 водный слой ДХМ. Объединяли органические слои, сушили над безводным MgSO₄,
 фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный
 материал на силикагеле, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-5%). Концентрировали
 15 при пониженном давлении и сушили под высоким вакуумом с получением рацемического
трет-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-[1-фторэтил]-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-
 1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (хирального в положении, обозначенном
 звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 0,23 г (выход 60%) в
 виде коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 504 (M+H).

20

Подготовительные синтезы 15 и 16

Изомер 1, *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-
 ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат

Изомер 2, *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-
 25 ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



Изомер 1

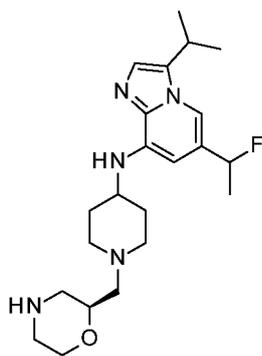
Изомер 2

Очищали рацемический *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-[1-фторэтил]-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат (0,23 г, 0,4 ммоль). [Прибор: SFC10 (Sepiatec); колонка: Chiralpak IG (25 x 2 см, 5 мкм); подвижная фаза: CO₂ (А)/ИПС (0,2% DMEA) (В); программа элюирования: изократическое при 40% В; давление на выходе: 100 бар; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 65 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм, с получением обоих выделенных энантиомеров:

- 10 Изомер 1: Описанным способом получали 72 мг *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (выход 19%) в виде коричневого твердого вещества. (Ахиральная чистота по ОФ-ЖХ/МС, Rt = 1,3 мин, 92%). ЭР/МС (m/z): 504 (M+H). (Хиральный анализ, Rt = 1,1 мин, э.и. >98%).
- 15 Изомер 2: Описанным способом получали 105 мг *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (выход 27%) в виде коричневого твердого вещества. (Ахиральная чистота по ОФ-ЖХ/МС, Rt = 1,3 мин, 90%). ЭР/МС (m/z): 504 (M+H). (Хиральный анализ, Rt = 1,4 мин, э.и. >98%).
- 20 Несмотря на то, что энантиомеры из подготовительных синтезов 15 и 16, изомер 1 и изомер 2, были разделены, конкретная хиральность каждого энантиомера в положении, обозначенном звездочкой, не установлена.

Подготовительный синтез 17

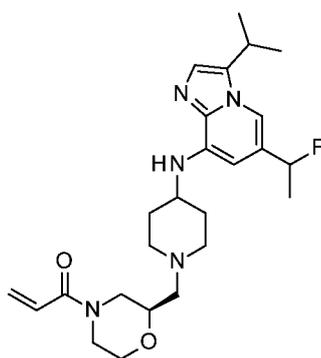
- 25 Изомер 1, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин



Добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,32 мл, 1,3 ммоль) к раствору изомера 1, *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (72 мг, 0,13 ммоль) в ДХМ (1,3 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении и очищали остаток на колонке SCX (10 г): 2 объема MeOH. Неочищенный материал растворяли в MeOH и загружали в колонку, промывали MeOH и элюировали 2 М раствором NH₃ в MeOH. Выпаривали основную фракцию с получением изомера 1, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин. После описанного подготовительного синтеза получали 55 мг (выход 98%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 404 (M+H).

Пример 1

Изомер 1, 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он

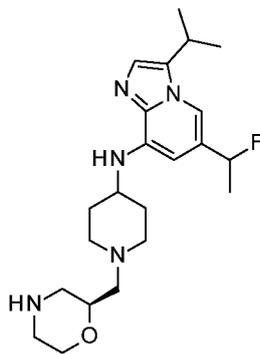


По каплям добавляли акрилоилхлорид (0,009 мл, 0,118 ммоль) к холодному раствору (на ледяной бане) изомера 1, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин (56 мг, 0,131 ммоль) и ТЭА (0,07 мл, 0,527 ммоль) в ДХМ (1,3 мл) и перемешивали смесь при указанной температуре в течение 30 минут. Гасили реакционную смесь насыщенным водным раствором NaHCO₃, перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут, добавляли воду и

экстрагировали ДХМ. Отделяли и объединяли органические фазы, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный материал на силикагеле, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-6%). Концентрировали при пониженном давлении и сушили под высоким вакуумом с получением изомера 1, 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она. После описанного 5
подготовительного синтеза получали 20 мг (выход 31%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 458 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, CDCl₃): 7,38 (с, 1H), 7,25 (с, 1H), 6,62-6,60 (м, 1H), 6,35 (дд, J= 1,7, 16,8 Гц, 1H), 6,09-6,07 (м, 1H), 5,77-5,74 (м, 1H), 5,70-5,55 (м, 1H), 10
4,60-4,56 (м, 1H), 4,01-3,95 (м, 2H), 3,69-3,65 (м, 3H), 3,34-3,32 (м, 5H), 2,66-2,61 (м, 7H), 1,75-1,68 (м, 5H), 1,40 (дд, J= 0,5, 6,8 Гц, 6H).

Подготовительный синтез 18

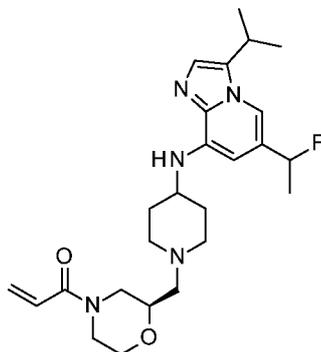
Изомер 2, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[[2S]-морфолин-2-ил]метил]-4-
15 пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин



Добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,4 мл, 1,8 ммоль) к раствору изомера 2, *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (90 мг, 0,18 ммоль) в ДХМ (1,8 мл) и 20
перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении и очищали остаток на колонке SCX (10 г): 2 объема MeOH. Неочищенный материал растворяли в MeOH и загружали в колонку, промывали MeOH и элюировали 2 М раствором NH₃ в MeOH. Выпаривали основную фракцию с получением изомера 2, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[[2S]-морфолин-2-ил]метил]-4-
25 пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин. После описанного подготовительного синтеза получали 75 мг (выход 98%) в виде бледно-коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 404 (M+H).

Пример 2

Изомер 2, 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он

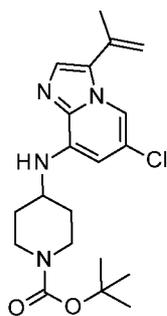


По каплям добавляли акрилоилхлорид (0,012 мл, 0,159 ммоль) к холодному
5 раствору (на ледяной бане) изомера 2, 6-(1-фторэтил)-3-изопропил-N-[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин] (75 мг, 0,176 ммоль) и ТЭА (0,098 мл, 0,706 ммоль) в ДХМ (1,7 мл) и перемешивали смесь при указанной температуре в течение 30 минут. Гасили реакционную смесь насыщенным водным раствором NaHCO_3 , перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут, добавляли воду и
10 экстрагировали ДХМ. Отделяли и объединяли органические фазы, и сушили над безводным MgSO_4 . Фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный материал на силикагеле, элюируя смесью $\text{MeOH}:\text{ДХМ}$ (градиент 0-6%). Концентрировали при пониженном давлении и сушили под высоким вакуумом с получением изомера 2, 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-фторэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она. После описанного
15 подготовительного синтеза получали 28 мг (выход 33%) в виде бледно-коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 458 ($M+H$). ^1H ЯМР (400,13 МГц, CDCl_3): 7,37 (с, 1H), 7,25 (с, 1H), 6,66-6,61 (м, 1H), 6,34 (дд, $J=1,7, 16,8$ Гц, 1H), 6,06 (с, 1H), 5,77-5,57 (м, 2H), 4,61-4,57 (м, 1H), 4,00-3,95 (м, 2H), 3,69-3,65 (м, 3H), 3,33-3,32 (м, 5H), 2,67-2,62 (м, 7H),
20 1,75-1,68 (м, 5H), 1,40 (д, $J=6,9$ Гц, 6H).

Подготовительный синтез 19

трет-бутил-4-[[6-хлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]пиперидин-1-карбоксилат

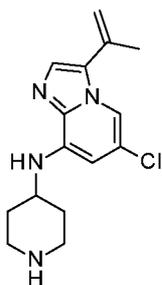
25



В емкость для работы при высоком давлении загружали 6,8-дихлор-3-изопрOPENИЛИМИДАЗО[1,2-а]ПИРИДИН (3,42 г, 12,3 ммоль), 1,4-ДИОКСАН (84 мл), *трет*-бутил-4-аминопиперидин-1-карбоксилат (3,05 г, 15,2 ммоль) и *трет*-бутоксид натрия (3,65 г, 38,0 ммоль). Через раствор барботировали N₂ и добавляли Brettphos Pd G3 (940 мг, 1,02 ммоль). Через полученную смесь снова барботировали N₂, закрывали пробирку и нагревали реакционную смесь при 95 °С в атмосфере N₂ в течение 2 часов. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры, разбавляли EtOAc и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Отделяли и органическую фазу и промывали насыщенным водным раствором NaCl, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали остаток флэш-хроматографией, элюируя смесью МТБЭ:гексаны (градиент 10-60%), затем смесью ацетон:гексаны (градиент 10-40%). Концентрировали при пониженном давлении и сушили с получением *трет*-бутил-4-[(6-хлор-3-изопрOPENИЛИМИДАЗО[1,2-а]ПИРИДИН-8-ИЛ)АМИНО]ПИПЕРИДИН-1-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 3,16 г (выход 62,8%) в виде желтого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 391 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 7,88 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 7,56 (с, 1H), 6,33 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 6,20 (д, J= 8,8 Гц, 1H), 5,35 (д, J= 30,3 Гц, 2H), 3,95 (д, J= 12,8 Гц, 2H), 3,72-3,62 (м, 1H), 2,99-2,81 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 1,90 (дд, J= 2,0, 12,7 Гц, 2H), 1,58-1,37 (м, 2H), 1,42 (с, 9H).

Подготовительный синтез 20

6-хлор-3-изопрOPENИЛ-N-(4-ПИПЕРИДИЛ)ИМИДАЗО[1,2-а]ПИРИДИН-8-АМИН



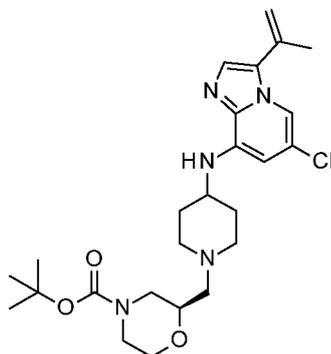
Добавляли ТФК (12 мл, 158,7 ммоль) к раствору *трет*-бутил-4-[(6-хлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]пиперидин-1-карбоксилата (2,96 г, 7,57 ммоль) в ДХМ (50 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении и растворяли остаток в MeOH.

5 Загружали раствор на картридж SCX (50 мг), предварительно обработанный MeOH. Элюировали MeOH и MeOH (7 н. NH₃). Собирали и концентрировали основные фракции в вакууме с получением 6-хлор-3-изопропенил-N-(4-пиперидил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина. После описанного подготовительного синтеза получали 2,2 г (выход 98,9%) в виде зеленого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 291 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО):

10 7,87 (д, J= 1,8 Гц, 1H), 7,55 (с, 1H), 6,26 (д, J= 1,5 Гц, 1H), 5,98 (д, J= 8,4 Гц, 1H), 5,35 (д, J= 29,7 Гц, 2H), 3,59-3,53 (м, 2H), 2,97-2,92 (м, 2H), 2,60 (гд, J= 12,1, 2,1 Гц, 2H), 2,17 (д, J= 0,6 Гц, 3H), 1,90-1,87 (м, 2H), 1,58-1,37 (м, 2H).

Подготовительный синтез 21

15 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[(6-хлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



Добавляли DIPEA (4 мл, 22,9 ммоль) к перемешиваемому раствору 6-хлор-3-изопропенил-N-(4-пиперидил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина (2,2 г, 7,5 ммоль) и *трет*-бутил-(2S)-2-(п-толилсульфонилоксиметил)морфолин-4-карбоксилата (3,4 г, 9,2 ммоль) в безводном ACN (25 мл). Перемешивали смесь при 100 °С в течение ночи. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и выпаривали летучие вещества при пониженном давлении. Очищали остаток флэш-хроматографией, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-10%). Концентрировали в вакууме с получением *трет*-бутил-

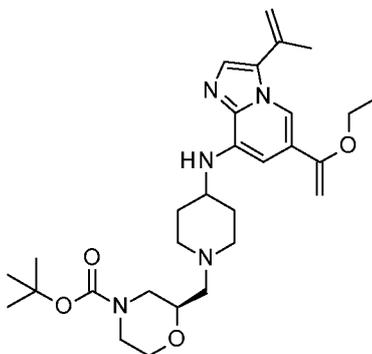
20 (2R)-2-[[4-[(6-хлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-

25 пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 2,18 г (выход 59%) в виде светло-зеленого полутвердого вещества. ЭР/МС (m/z): 490 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 7,80 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 6,09 (д, J= 1,7 Гц, 1H), 5,34-5,25 (м, 3H), 4,02-3,97 (м, 3H), 3,60-3,52 (м, 3H),

2,95 (д, J= 8,3 Гц, 3H), 2,69-2,63 (м, 2H), 2,38-2,25 (м, 3H), 2,13-2,10 (м, 2H), 1,75-1,65 (м, 3H), 1,49 (с, 9H).

Подготовительный синтез 22

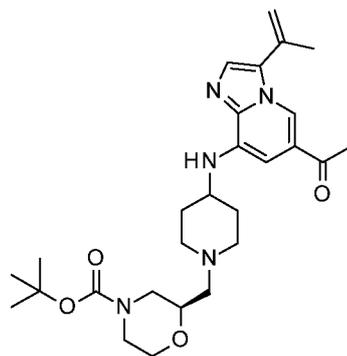
5 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-этоксивинил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



В пробирку для работы в микроволновом реакторе добавляли раствор *трет*-бутил-
10 (2R)-2-[[4-[[6-хлор-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-
пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (0,42 г, 0,85 ммоль) в толуоле (17 мл),
трибутил(1-этоксивинил)олово (0,39 мл, 1,12 ммоль), хлор-(2-дициклогексилфосфино-
2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)(2'-амино-1,1'-бифенил-2-ил)палладий (II) (75 мг, 0,093
ммоль) и CsF (0,26 г, 1,71 ммоль). Через реакционную смесь барботировали N₂ в течение 5
15 минут, закрывали пробирку и нагревали при 100 °С в течение 3 часов. Охлаждали до
комнатной температуры, к неочищенной смеси добавляли EtOAc и фильтровали через
слой диатомовой земли, промывая EtOAc. Удаляли летучие вещества при пониженном
давлении с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-этоксивинил)-3-
изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-
20 карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 0,757 г
(неочищенный материал) в виде коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 526
(M+H).

Подготовительный синтез 23

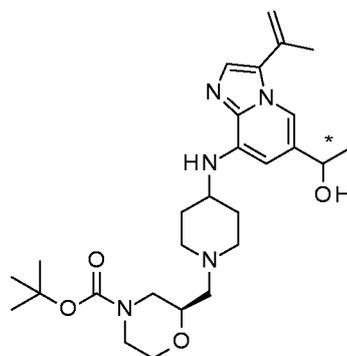
25 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-ацетил-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-
пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



Добавляли раствор HCl в воде (4 мл, 0,2 М) к раствору *tert*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-этоксивинил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (0,72 г, 0,82 ммоль) в 2-пропаноле (1,5 мл).
 5 Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли EtOAc, затем насыщенный водный раствор NaHCO₃ и перемешивали смесь в течение 1 часа при комнатной температуре. Отделяли органический слой, промывали водой, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали остаток флэш-хроматографией, элюируя смесью EtOH:гексаны
 10 (градиент 20-50%), с получением *tert*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-ацетил-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил)амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 0,25 г (выход 58%) в виде коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 498 (M+H). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 8,50 (д, J= 1,3 Гц, 1H), 7,65 (с, 1H), 6,54 (д, J= 1,1 Гц, 1H), 5,87 (д, J= 8,6 Гц, 1H), 5,51 (с, 1H), 5,40 (с, 1H), 3,89-3,77 (м, 3H), 3,50-3,43 (м, 4H), 2,90-2,75 (м, 3H), 2,60 (с, 15 3H), 2,42-2,33 (м, 2H), 2,28-2,10 (м, 4H), 1,97-1,78 (м, 2H), 1,65-1,54 (м, 3H), 1,41 (с, 9H).

Подготовительный синтез 24

Рац-*tert*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат
 20

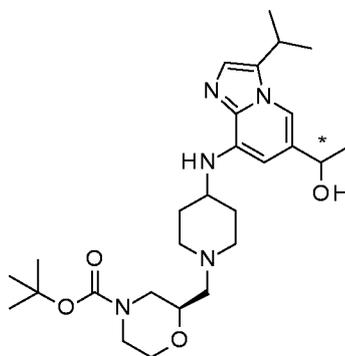


Добавляли NaBH_4 (0,04 г, 1,03 ммоль) к раствору *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-ацетил-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (0,39 г, 0,756 ммоль) в EtOH (7,5 мл). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли воду, затем EtOAc для нейтрализации избытка NaBH_4 . Отделяли органический слой, сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением рацемического *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (хирального в положении, обозначенном звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 0,376 г (неочищенный материал, выход 94%) в виде коричневого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 500 (M+H). ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 7,83 (с, 1H), 7,50 (с, 1H), 6,21 (с, 1H), 5,54-5,18 (м, 4H), 4,75-4,69 (м, 1H), 4,09 (к, J = 5,3 Гц, 1H), 3,90-3,77 (м, 3H), 3,52-3,27 (м, 5H), 2,92-2,88 (м, 2H), 2,42-2,33 (м, 2H), 2,18-2,15 (м, 4H), 2,02-1,95 (м, 2H), 1,41-1,36 (м, 14H).

15

Подготовительный синтез 25

Рац-*трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат

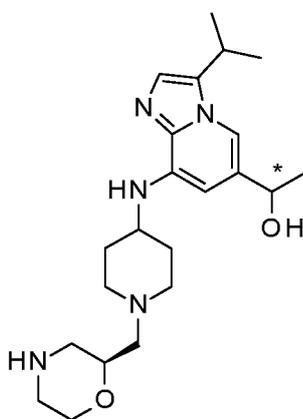


Добавляли палладий (10% мас.) в катализаторе Lindlar (0,25 г, 0,23 ммоль) к раствору рацемического *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропенилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (0,29 г, 0,59 ммоль) в MeOH (30 мл). Через полученную смесь барботировали N_2 , затем осуществляли три цикла вакуумирования и заполнения H_2 . Перемешивали реакционную смесь в атмосфере H_2 (1 атм) при комнатной температуре в течение 5 часов. Фильтровали реакционную смесь через слой диатомовой земли и тщательно промывали MeOH. Удаляли летучие вещества при пониженном давлении и сушили с получением рацемического *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-

карбоксилата (хирального в положении, обозначенном звездочкой). После описанного
подготовительного синтеза получали 0,18 г (выход 55,6%) в виде коричневого твердого
вещества. ЭР/МС (m/z): 502 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 7,47 (с, 1H), 7,15 (д, J=
0,7 Гц, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,43-5,41 (м, 1H), 5,27-5,22 (м, 1H), 4,72-4,68 (м, 1H), 3,90-3,85 (м,
5 4H), 3,50-3,27 (м, 8H), 3,23-3,16 (м, 1H), 2,96-2,93 (м, 4H), 2,40-2,33 (м, 2H), 2,29-2,28 (м,
2H), 2,03-2,00 (м, 2H), 1,41-1,29 (м, 14H).

Подготовительный синтез 26

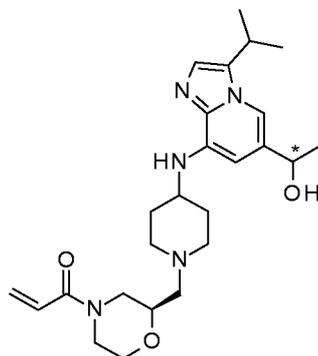
10 Рац-1-[3-изопропил-8-[[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]амино]имидазо[1,2-
а]пиридин-6-ил]этанол



Добавляли ТФК (0,5 мл) к раствору рацемического *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[6-(1-
гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-
пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (160 мг, 0,319 ммоль) в ДХМ (3 мл).
15 Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов.
Выпаривали растворитель при пониженном давлении и очищали остаток с помощью SCX
(картридж 10 г), элюировали MeOH (3 объема колонки), затем 2 н. раствором NH₃ в MeOH
(3 объема колонки). Объединяли основные фракции и удаляли растворитель в вакууме с
получением рацемического 1-[3-изопропил-8-[[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-
20 пиперидил]амино]имидазо[1,2-а]пиридин-6-ил]этанола (хирального в положении,
обозначенного звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 120
мг (выход 88%) в виде коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 402 (M+H). ¹H ЯМР
(400,13 МГц, ДМСО): 7,47 (с, 1H), 7,15 (с, 1H), 6,12 (с, 1H), 5,39 (д, J= 8,4 Гц, 1H), 5,18-
5,11 (м, 1H), 4,74-4,65 (м, 1H), 3,72-3,63 (м, 1H), 3,50-3,45 (м, 4H), 3,23-3,14 (м, 2H), 2,90-
25 2,73 (м, 2H), 2,70-2,63 (м, 2H), 2,43-2,41 (м, 4H), 2,04-2,01 (м, 2H), 1,62-1,55 (м, 2H), 1,38-
1,29 (м, 10H).

Пример 3

Рац-1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он



5 Добавляли DIPEA (156 мкл, 0,894 ммоль) к раствору рацемического 1-[3-изопропил-8-[[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]амино]имидазо[1,2-а]пиридин-6-ил]этанола (120 мг, 0,299 ммоль) в ацетонитриле (5 мл). Охлаждали реакционную смесь при 0 °С и по каплям добавляли раствор проп-2-еноилхлорида (25 мкл, 0,307 ммоль) в ДХМ (1,5 мл). Перемешивали полученную смесь при 0 °С в

10 течение 60 минут. Выпаривали растворитель при пониженном давлении. Обработывали реакционную смесь насыщенным раствором NaHCO₃ и экстрагировали EtOAc. Промывали органический слой водой, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали остаток флэш-хроматографией, элюируя смесью 7 н. раствора NH₃ в MeOH: ДХМ (градиент 0-10%).

15 Концентрировали соответствующие фракции с получением рац-1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она (хирального в положении, обозначенного звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 72 мг (выход 47%) в виде желтого маслянистого вещества. ЭР/МС (m/z): 456 (M+H).

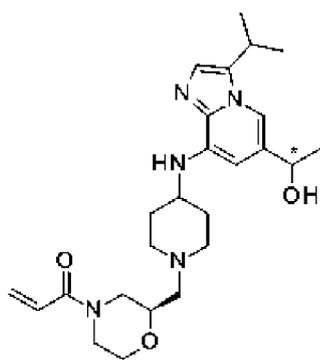
20

Примеры 4 и 5

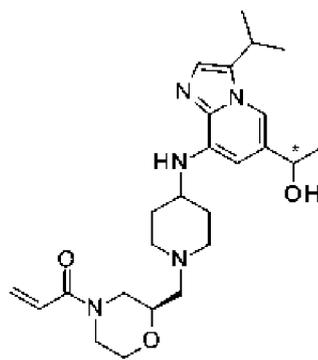
Изомер 3: 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он,

Изомер 4: 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он

25



Изомер 3



Изомер 4

Очищали рацемический 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он (0,072 г, 0,141 ммоль) методом хиральной хроматографии. [Прибор: SFC10 (Sepiatec), колонка: Chiralpak AD (25 см x 2 см, 5 мкм). Подвижная фаза: CO₂ (А)/MeOH (0,2% DMEA) (В). Программа элюирования: изократическое при 20%. Поток 65 мл/мин. Загрузка: объем ввода пробы 15 мг каждые 9,92 мин], с получением обоих выделенных энантиомеров:

Изомер 3: Описанным способом получали 18,4 мг 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она (выход 27%) в виде бледно-желтого маслянистого вещества. (Ахиральная чистота по ОФ-ЖХ/МС, Rt = 0,87 мин, 96%). (Хиральный анализ, Rt = 0,92 мин, э.и. >98%). ЭР/МС (m/z): 456 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 7,47 (с, 1H), 7,15 (с, 1H), 6,82-6,75 (м, 1H), 6,15-6,11 (м, 2H), 5,71 (д, J= 10,3 Гц, 1H), 5,47-5,39 (м, 1H), 5,14 (д, J= 4,4 Гц, 1H), 4,73-4,67 (м, 1H), 4,41-4,23 (м, 1H), 4,00-3,86 (м, 2H), 3,51-3,47 (м, 3H), 3,25-3,20 (м, 1H), 3,01-2,92 (м, 3H), 2,48-2,33 (м, 3H), 2,30-2,17 (м, 2H), 1,95-1,92 (м, 2H), 1,58-1,50 (м, 2H), 1,38-1,29 (м, 9H).

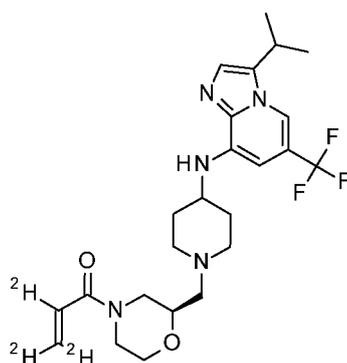
Изомер 4: Описанным способом получали 24,5 мг 1-[(2R)-2-[[4-[[6-(1-гидроксиэтил)-3-изопропилимидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она (выход 36,7%) в виде бледно-желтого маслянистого вещества. (Ахиральная чистота по ОФ-ЖХ/МС, Rt = 0,87 мин, 97%). (Хиральный анализ, Rt = 1,16 мин, э.и. >90%). ЭР/МС (m/z): 456 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 7,47 (с, 1H), 7,15 (с, 1H), 6,79 (дд, J= 10,4, 16,5 Гц, 1H), 6,15-6,11 (м, 2H), 5,71 (д, J= 10,3 Гц, 1H), 5,44-5,39 (м, 1H), 5,15 (д, J= 4,4 Гц, 1H), 4,73-4,67 (м, 1H), 4,41-4,14 (м, 1H), 3,97-3,80 (м, 3H), 3,23-3,13 (м, 2H), 2,98-2,85 (м, 3H), 2,45-2,33 (м, 3H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,95-1,92 (м, 2H), 1,60-1,47 (м, 2H), 1,38-1,29 (м, 9H).

Несмотря на то, что энантимеры из примеров 4 и 5, изомер 3 и изомер 4, были разделены, конкретная хиральность каждого энантиомера в положении, обозначенном звездочкой, не установлена.

5

Пример 6

2,3,3-тридейтеро-1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он



10 Добавляли 2,4,6-трипропил-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфоран-2,4,6-триоксид (50% в ДМФА) (0,25 мл, 0,42 ммоль) к раствору 2,3,3-тридейтеропроеп-2-еновой кислоты (0,029 г, 0,3863 ммоль), полученной так, как описано в *Adv. Synth. Catal.* **2018**, 360, 2303, и 3-изопропил-N-[1-[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-

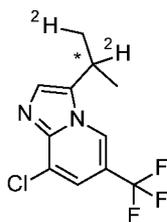
15 (трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-аминa (0,15 г, 0,35 ммоль) в сухом ДМФА (3 мл) и ТЭА (0,2 мл, 1 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали смесь в течение 2 часов. Гасили реакционную смесь 1 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃ и экстрагировали МТБЭ (дважды). Отделяли и объединяли органические фазы, и сушили над безводным Na₂SO₄. Фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали неочищенный материал, элюируя смесью ДХМ:(ДХМ:MeOH 9/1) (0%,

20 изократическое), затем градиентом ДХМ:(ДХМ:MeOH 9/1) (градиент 0-60%). Концентрировали при пониженном давлении и сушили под высоким вакуумом с получением 2,3,3-тридейтеро-1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она. После описанного подготовительного синтеза получали 85,6 мг (выход 50%) в виде белого

25 твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 482 (M+H). (Ахиральное Rt= 1,128 мин, 100%). ¹H ЯМР (400,21 МГц, ДМСО): 8,02 (с, 1H, NH), 7,34 (с, 1H), 6,11-6,03 (м, 1H), 4,40-4,12 (м, 1H), 4,00-3,80 (м, 2H), 3,51-3,27 (м, 3H), 3,22-3,08 (м, 1H), 2,90-2,80 (м, 3H), 2,41-2,40 (д, J= 5,5 Гц, 2H), 2,25-2,14 (м, 2H), 1,91-1,88 (м, 2H), 1,63-1,55 (м, 2H), 1,30 (д, J= 6 Гц, 6H).

Подготовительный синтез 27

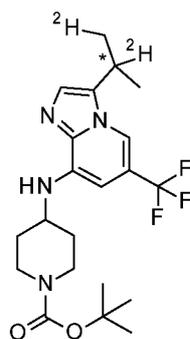
8-хлор-3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-*a*]пиридин



В перчаточном боксе разделяли поровну тетрафторборат 1,1'-бис(ди-
5 изопропилфосфино)ферроцен-(1,5-циклооктадиен)родия (I) (0,124 г, 0,17 ммоль) между
тремя пробирками Biotage объемом 10-20 мл с мешалками. Растворяли 8-хлор-3-
изопронил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-*a*]пиридин (1,84 г, 7,04 ммоль) в ТГФ (24 мл) и
разделяли раствор поровну между тремя флаконами. Закрывали флаконы и вынимали из
перчаточного бокса. Ставили флаконы в автоклав (вместе). В каждый флакон вставляли
10 иглу для обеспечения потока газа. Закрывали автоклав и три раза продували дейтерием до
конечного давления 80 фунт/кв. дюйм (552 кПа). Перемешивали смесь в течение 3 часов 40
минут. Стравливали давление в автоклаве и открывали три пробирки, содержащие
оранжевый раствор. Смывали в колбу с EtOAc. Объединяли содержимое трех пробирок и
удаляли растворитель при пониженном давлении. Растворяли остаток в ДХМ и очищали
15 на силикагеле, используя градиент EtOAc: ДХМ (градиент 0-20%). Удаляли растворитель
при пониженном давлении с получением 8-хлор-3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-
(трифторметил)имидазо[1,2-*a*]пиридина (хирального в положении, обозначенном
звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 1,72 г (выход 92%) в
виде светло-желтого твердого вещества. ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$): 265/267. ^1H ЯМР
20 (399,80 МГц, ДМСО): 8,93-8,92 (м, 1H), 7,75 (д, $J = 1,5$ Гц, 1H), 7,63 (с, 1H), 1,31-1,30 (м,
5H).

Подготовительный синтез 28

25 *трет*-бутил-4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-
а]пиридин-8-ил]амино]пиперидин-1-карбоксилат

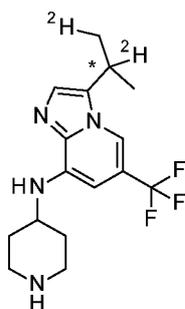


В закрывающуюся пробирку добавляли 8-хлор-3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-
 6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин (0,503 г, 1,90 ммоль), трет-бутил-4-
 5 аминопиперидин-1-карбоксилат (0,418 г, 2,09 ммоль), трет-бутоксид натрия (0,6 г,
 6 ммоль) и 1,4-диоксан (10 мл). Продували смесь N₂, затем вакуумировали (3 цикла).
 Добавляли Brettphos Pd G3 (0,1 г, 0,1 ммоль), снова продували N₂ и вакуумировали,
 закрывали пробирку и нагревали смесь при 95 °С в течение 2,5 часа. Охлаждали
 10 реакционную смесь до комнатной температуры, разбавляли смесь МТБЭ и промывали
 водой. Отделяли органическую фазу и экстрагировали водный слой МТБЭ (3X).
 Объединяли органические фазы, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и
 концентрировали при пониженном давлении с получением коричневого маслянистого
 остатка. Очищали остаток на силикагелевом картридже, элюируя смесью ДХМ/гексан и
 ДХМ/МеОН (1:1) (градиент 0-2%). Собирали соответствующие фракции, удаляли летучие
 15 вещества и сушили под высоким вакуумом с получением *трет*-бутил-4-[[3-[рац-1,2-
 дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]пиперидин-
 1-карбоксилата (хирального в положении, обозначенном звездочкой). После описанного
 подготовительного синтеза получали 0,52 г (выход 55%) в виде желтой пены. ЭР/МС
 (m/z): 429 (M+H).

20

Подготовительный синтез 29

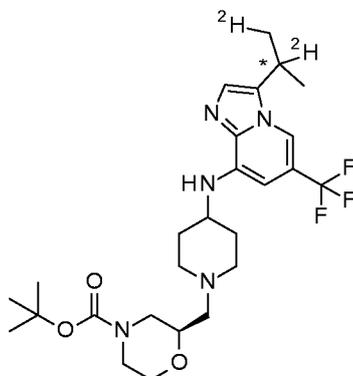
3-(рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил)-N-(4-пиперидил)-6-(трифторметил)имидазо[1,2-
 а]пиридин-8-амин



Добавляли ТФК (1,6 мл, 21 ммоль) к раствору *трет*-бутил-4-[[3-[рац-1,2-
 дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]пиперидин-
 1-карбоксилата (0,524 г, 1,05 ммоль) в ДХМ (7 мл) и перемешивали смесь при комнатной
 5 температуре в течение 3 часов. Обрабатывали реакционную смесь водой (20 мл), отделяли
 органический слой и отбрасывали. Обрабатывали водный слой насыщенным раствором
 NaHCO₃ и экстрагировали ДХМ (3X 20 мл). Объединяли органические фазы, сушили над
 безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением 3-(рац-1,2-дидейтеро-
 1-метилэтил)-N-(4-пиперидил)-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина
 10 (хирального в положении, обозначенном звездочкой). После описанного
 подготовительного синтеза получали 0,274 г (выход 78%) в виде желтого твердого
 вещества. ЭР/МС (m/z) 329 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (400,21 МГц, CDCl₃): 7,68 (д, J= 1,2 Гц, 1H),
 7,29 (д, J= 7,1 Гц, 1H), 6,15 (д, J= 1,2 Гц, 1H), 5,36-5,32 (м, 1H), 3,62-3,53 (м, 1H), 3,22 (д, J=
 11,7 Гц, 2H), 2,83 (т, J= 10,0 Гц, 2H), 2,25-2,04 (м, 3H), 1,58-1,50 (м, 2H), 1,40-1,39 (м, 5H).
 15

Подготовительный синтез 30

трет-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-
 (трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-
 20 карбоксилат



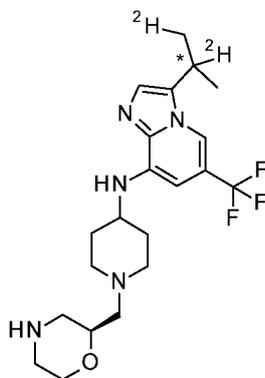
В закрывающуюся пробирку добавляли 3-(рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил)-N-(4-
 пиперидил)-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин (0,27 г, 0,82 ммоль), трет-

бутил-(2S)-2-(п-толилсульфонилоксиметил)морфолин-4-карбоксилат (0,361 г, 0,97 ммоль) и ACN (4 мл). К полученному оранжевому раствору добавляли ТЭА (0,23 мл, 1,7 ммоль). Закрывали емкость и нагревали смесь при 95 °С в течение 24 часов. Удаляли летучие вещества под вакуумом и обрабатывали остаток ДХМ (20 мл) и водой (20 мл). Отделяли органический слой и экстрагировали водный слой ДХМ (2х). Сушили объединенные органические слои над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Очищали остаток на силикагеле, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-3%). Объединяли соответствующие фракции, удаляли летучие вещества и сушили под высоким вакуумом с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (хирального в положении, обозначенном звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 0,34 г (выход 69%) в виде красноватого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 528 (M+H).

15

Подготовительный синтез 31

3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-N-[1-[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин

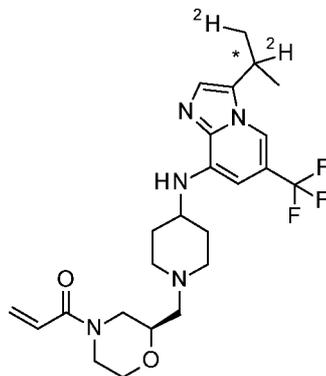


Добавляли ТФК (0,855 мл, 11,3 ммоль) к раствору трет-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (338 мг, 0,56 ммоль) в ДХМ (5 мл). Перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Обработывали реакционную смесь насыщенным водным раствором NaHCO₃ (30 мл) и экстрагировали ДХМ (2 x 15 мл). Объединяли органические фазы, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 3-(рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил)-N-[1-[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин (хирального в положении, обозначенном

звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 222 мг (выход 82,3%) в виде красноватой пены. ЭР/МС (m/z): 428 (M+H).

Пример 7

5 1-[(2R)-2-[[4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он

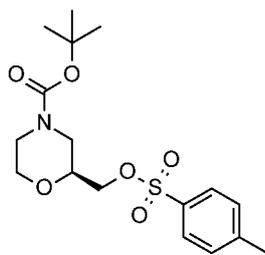


Добавляли ТЭА (0,199 мл, 1,43 ммоль), затем акрилоилхлорид (0,048 мл, 0,58 ммоль) к раствору 3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-N-[1-[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина (220 мг, 0,46 ммоль) в дихлорметане (2,2 мл), охлажденному до 0 °С. Перемешивали полученную смесь при указанной температуре в течение 20 минут. Гасили реакционную смесь, используя 5 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃, и экстрагировали ДХМ (2x). Объединяли органические слои, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при 15 пониженном давлении. Очищали остаток на силикагеле, элюируя смесью MeOH:ДХМ (градиент 0-4%). Объединяли соответствующие фракции, удаляли летучие вещества и сушили под высоким вакуумом с получением 1-[(2R)-2-[[4-[[3-[рац-1,2-дидейтеро-1-метилэтил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она (хирального в положении, 20 обозначенном звездочкой). После описанного подготовительного синтеза получали 103 мг (выход 45,3%) в виде красноватой пены. ЭР/МС (m/z): 482 (M+H). ¹H ЯМР (400,21 МГц, CD₃OD): 7,96 (с, 1H), 7,34 (с, 1H), 6,83-6,73 (м, 1H), 6,30-6,22 (м, 2H), 5,79 (д, J= 10,5 Гц, 1H), 4,48-4,45 (м, 4H), 4,07-3,96 (м, 2H), 3,68-3,56 (м, 3H), 3,15-2,91 (м, 2H), 2,67-2,49 (м, 4H), 2,13 (дд, J= 4,0, 8,9 Гц, 2H), 1,75-1,67 (м, 2H), 1,40-1,38 (м, 5H).

25

Подготовительный синтез 33

трет-бутил-(2S)-2-(*п*-толилсульфонил оксиметил)морфолин-4-карбоксилат

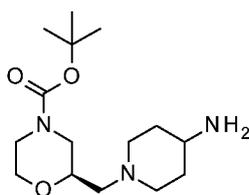


Добавляли DMAP (5,62 г, 46,1 ммоль, 0,1 экв.), ТЭА (112 г, 154 мл, 1,11 моль, 2,4 экв.) и *p*-толуолсульфонилхлорид (105,4 г, 553 ммоль, 1,2 экв.) к раствору *tert*-бутил-(2*S*)-2-(гидроксиметил)морфолин-4-карбоксилата (100 г, 461 ммоль) в ТГФ (921 мл) и перемешивали смесь в течение 24 часов при 23 °С. Добавляли 9% водный раствор NaHCO₃ (1151 мл) и экстрагировали EtOAc (506 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (506 мл), сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. К остатку добавляли гептан (1000 мл) и перемешивали в течение 24 часов. Фильтровали, промывали гептаном (2 x 150 мл) и сушили под потоком воздуха в течение 1 часа и под вакуумом 10 мбар при 45 °С в течение ночи с получением *tert*-бутил-(2*S*)-2-(*p*-толилсульфонилоксиметил)морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 147 г (выход 86%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС *m/z* 394 [M+Na]⁺.

15

Подготовительный синтез 34

tert-бутил-(2*R*)-2-[(4-амино-1-пиперидил)метил]морфолин-4-карбоксилат



В емкость для работы под давлением загружали *tert*-бутил-(2*S*)-2-(*p*-толилсульфонилоксиметил)морфолин-4-карбоксилат (81,2 г, 216 ммоль), пиперидин-4-амин (43,3 г, 433 ммоль, 2 экв.), метилэтилкетон (216 мл) и DIPEA (55,9 г, 75,5 мл, 433 ммоль, 2 экв.). Перемешивали смесь при 80 °С в течение 40 часов. Отключали нагрев, охлаждали до 23 °С, разбавляли МТБЭ (649 мл), промывали водой (649 мл), 5% водным раствором лимонной кислоты (649 мл) и снова экстрагировали водную фазу МТБЭ (649 мл). Подщелачивали объединенные органические фазы, перемешивая с 18 М водным раствором NaOH (35,3 мл), и экстрагировали ДХМ (3 x 649 мл). Сушили объединенные органические слои над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме.

25

Суспендировали остаток в гептане (649 мл) в течение 2 часов, фильтровали, концентрировали в вакууме и сушили при давлении 10 мбар при 45 °С в течение 48 часов с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[(4-амино-1-пиперидил)метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 47,7 г (выход 69%) в виде бесцветного маслянистого вещества. ЭР/МС m/z 300 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,34-1,62 (м, 2H), 1,47 (с, 9H), 1,71-1,85 (м, 2H), 2,00-2,18 (м, 2H), 2,20-2,38 (м, 1H), 2,50 (дд, 1H), 2,54-2,74 (м, 2H), 2,83-2,99 (м, 2H), 3,44-3,63 (м, 2H), 3,78-4,04 (м, 4H).

Подготовительный синтез 35

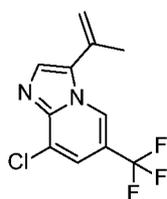
8-хлор-3-иод-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин



Добавляли NIS (69,5 г, 303 ммоль, 1,3 экв.) к раствору 8-хлор-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина (51,4 г, 233 ммоль) в ACN (1164 мл) и перемешивали смесь при 23 °С в течение 72 часов. Концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в 2-МеТГФ (514 мл) и промывали 25% водным раствором Na₂S₂O₃ (514 мл) и 9% водным раствором NaHCO₃ (3 x 514 мл). Сушили органическую фазу над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 8-хлор-3-иод-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 71,3 г (выход 88%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 346/348. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,53 (д, 1H), 7,89 (с, 1H), 8,46 (м, 1H).

Подготовительный синтез 36

8-хлор-3-изопронил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин



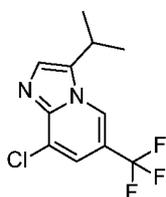
В атмосфере N₂ дегазировали смесь 8-хлор-3-иод-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина (25,1 г, 72,4 ммоль), EtOH (483 мл) и 1,2 М водного раствора K₂CO₃ (180 мл) в течение 5 минут. Добавляли 2-изопронил-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (14,1 г, 79,6 ммоль, 1,1 экв.) BrettPhos Pd G3 (1,67 г, 1,81 ммоль, 0,025 экв.) и дегазировали

5 в течение 5 минут. Перемешивали при 23 °С в течение 24 часов. Концентрировали в вакууме, растворяли остаток в 2-МеТГФ (251 мл) и промывали водой (125 мл). Сушили органическую фазу над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток хроматографией на силикагеле, используя смесь EtOAc: гексан (градиент 0-50%), с получением 8-хлор-3-изопропенил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 16,9 г (выход 85%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 261/263. ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 2,22 (м, 3H), 5,47 (м, 1H), 5,51 (м, 1H), 7,70 (д, 1H), 7,86 (с, 1H), 8,61 (м, 1H).

10

Подготовительный синтез 37

8-хлор-3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин

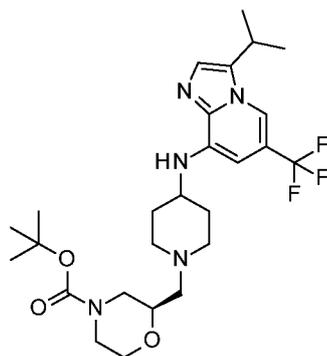


15 В атмосфере N₂ дегазировали смесь 8-хлор-3-изопропенил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина (33,2 г, 110 ммоль), платины (20,1 г, 2,31 ммоль, 0,021 экв.) и MeOH (659 мл). Заменяли атмосферу N₂ на H₂, используя три цикла вакуумирования. Перемешивали смесь при 23 °С в течение 8 часов. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали MeOH. Концентрировали в вакууме. Очищали остаток хроматографией на силикагеле, используя смесь EtOAc: гексан (градиент 10-70%), с получением 8-хлор-3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина. После описанного подготовительного синтеза получали 24,2 г (выход 65%) в виде желтого твердого вещества. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 263/265. ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 1,33 (д, 6H), 3,51 (дк, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,75 (д, 1H), 8,92 (м, 1H).

20

Подготовительный синтез 38

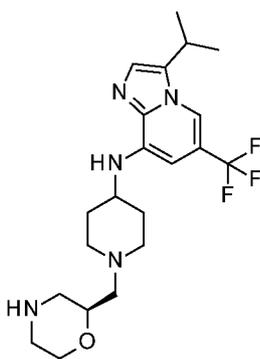
25 *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилат



В атмосфере N₂ дегазировали смесь 8-хлор-3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридина (22,7 г, 79,2 ммоль), *трет*-бутил-(2R)-2-[(4-амино-1-пиперидил)метил]морфолин-4-карбоксилата (37,9 г, 119 ммоль, 1,5 ммоль), *трет*-бутоксид натрия (23,5 г, 238 ммоль, 3 экв.) и 1,4-диоксана (396 мл). Добавляли BrettPhos Pd G3 (4,53 г, 4,75 ммоль, 0,06 экв.) и дегазировали смесь в течение 5 минут. Нагревали при 100 °С в течение 48 часов. Охлаждали до 23 °С, концентрировали в вакууме, растворяли остаток в 2-МеТГФ (227 мл) и промывали водой (127 мл). Экстрагировали водную фазу 2-МеТГФ (114 мл), сушили объединенные органические слои над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата. После описанного подготовительного синтеза получали 59,7 г (чистота 70%, выход 100%) в виде коричневого смолистого вещества. ЭР/МС *m/z* 526 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 1,30 (д, 6H), 1,41 (с, 9H), 1,52-1,68 (м, 2H), 1,81-1,95 (м, 2H), 2,09-2,29 (м, 2H), 2,31-2,43 (м, 2H), 2,75-2,94 (м, 3H), 3,25-3,58 (м, 5H), 3,62-3,92 (м, 3H), 6,07 (д, 1H), 6,21 (д, 1H), 7,34 (д, 1H), 8,03 (м, 1H).

Подготовительный синтез 39

3-изопропил-N-[1-[[[(2S)-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амин

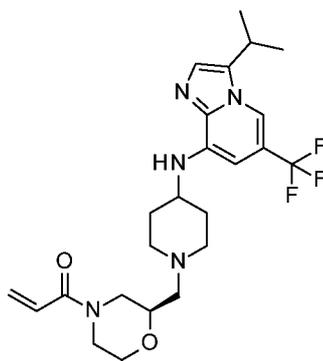


Добавляли раствор HCl в воде (5,5 М, 86 мл, 6 экв.) к суспензии *трет*-бутил-(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-карбоксилата (59,5 г, чистота 70%, 79,1 ммоль) в 2-пропаноле (476 мл). Нагревали смесь при 95 °С в течение 4 часов. Охлаждали до 23 °С и концентрировали в вакууме. Суспендировали остаток в 2-МеТГФ (476 мл), добавляли 2 М водный раствор NaOH (198 мл) и перемешивали при 23 °С в течение 5 минут. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали 2-МеТГФ. Органическую фазу экстрагировали 20% водным раствором лимонной кислоты (2 x 476 мл). Объединенные водные фазы обрабатывали 18,4 М водным раствором NaOH (476 мл) и экстрагировали 2-МеТГФ (2 x 476 мл). Сушили объединенные органические слои над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток обрабатывали при 23 °С тиольной смолой SiliaMetS[®] (40-63 мкм; загрузка = 1,46 ммоль/г; 10,8 г, 15,7 ммоль) и нагревали до 65 °С в течение 18 часов. Охлаждали до 23 °С, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 3-изопропил-N-[1-[[2S]-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина. После описанного подготовительного синтеза получали 27,2 г (выход 76%) в виде оранжевого твердого вещества. ЭР/МС *m/z* 426 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ 1,30 (д, 6H), 1,51-1,68 (м, 2H), 1,80-1,94 (м, 2H), 2,07-2,23 (м, 2H), 2,23-2,42 (м, 3H), 2,58-2,76 (м, 2H), 2,76-2,92 (м, 3H), 3,28-3,59 (м, 5H), 3,66-3,78 (м, 1H), 6,04 (д, 1H), 6,21 (шс, 1H), 7,34 (шс, 1H), 8,02 (м, 1H).

20

Пример 8

1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-он



По каплям добавляли ТЭА (16,3 г, 22,4 мл, 161 ммоль, 4 экв.) и раствор акрилоилхлорида (3,79 г, 3,40 мл, 40,1 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (34 мл) к раствору 3-изопропил-N-[1-[[2S]-морфолин-2-ил]метил]-4-пиперидил]-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-амина (17,7 г, 40,1 ммоль) в ДХМ (268 мл) при 0

°C и перемешивали в течение 15 минут. Добавляли 9% водный раствор NaHCO₃ (142 мл), сушили органическую фазу над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очищали остаток хроматографией на силикагеле, используя смесь MeOH: ДХМ (градиент 0-10%), с получением 1-[(2R)-2-[[4-[[3-изопропил-6-(трифторметил)имидазо[1,2-а]пиридин-8-ил]амино]-1-пиперидил]метил]морфолин-4-ил]проп-2-ен-1-она. После описанного подготовительного синтеза получали 12,9 г (выход 67%) в виде бежевой пены. ЭР/МС *m/z* 480 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (d₆-DMCO) δ 1,30 (д, 6H), 1,52-1,71 (м, 2H), 1,83-1,95 (м, 2H), 2,10-2,30 (м, 2H), 2,36-2,46 (м, 2H), 2,74-3,23 (м, 3H), 3,31-3,60 (м, 5H), 3,78-4,02 (м, 2H), 4,08-4,47 (м, 1H), 5,71 (д, 1H), 6,06 (м, 1H), 6,14 (дд, 1H), 6,22 (д, 1H), 6,79 (дд, 1H), 7,39 (д, 1H), 8,02 (м, 1H).

Биологические анализы

Следующие анализы демонстрируют, что соединения, описанные в данном документе, являются ингибиторами активности CDK7. Результаты указанных анализов также демонстрируют, что соединения, описанные в данном документе, ингибируют передачу сигналов CDK7 в раковых клетках. Кроме того, соединения, описанные в данном документе, ингибируют пролиферацию раковых клеточных линий и рост опухоли в модели ксенотрансплантата опухоли ракового заболевания.

«IC₅₀» относится к концентрации агента, вызывающей 50% от максимального ингибирующего ответа, возможного для данного агента, или, альтернативно, к концентрации агента, вызывающей 50% замещение лиганд-специфического связывания с рецептором; относительные значения IC₅₀ определяют с помощью единиц флуоресценции посредством расчета процентного ингибирования относительно контрольных образцов «MIN» и «MAX», находящихся на планшете, с последующей подгонкой данных на десятиточечной кривой зависимости ответа от дозы к четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Анализ активности киназы CDK7 и CDK9

Цель представленных анализов заключалась в измерении способности соединений, описанных в данном документе, ингибировать киназную активность комплекса CDK7/циклин H/Mat1. Для демонстрации того, проявляют ли соединения, описанные в данном документе, какую-либо аффинность в отношении CDK7 и CDK9, проводили биохимические анализы без предварительной инкубации фермента с соединением или с предварительной инкубацией в течение 3 часов. Функциональные анализы обеспечивают подтверждение того, проявляют ли соединения, описанные в данном документе,

5 способность ингибировать киназную активность CDK7 и CDK9. Все лиганды, растворители и реагенты, использованные в следующих анализах, без труда доступны из коммерческих источников или могут быть без труда синтезированы специалистом в данной области техники. Определение IC₅₀ для CDK7 и CDK9 проводили следующим образом.

Биохимический анализ ингибирования CDK7/циклин H/MAT1

10 Значение IC₅₀ активности соединений, описанных в данном документе, определяли с помощью анализов связывания с фильтром с радиоактивной меткой (FB), используя очищенный рекомбинантный фермент человека в присутствии АТФ/[³³P]АТФ и пептидного субстрата. Выбранные концентрации АТФ равны или близки к значению K_m фермента для АТФ.

15 Реакции проводили в 96-луночных полистирольных планшетах в конечном объеме 25 мкл на лунку. Смешивали 5 мкл экспериментального соединения в 20% ДМСО, 10 мкл раствора субстрата (АТФ/³³P-АТФ и чередование CDK7/9) и 10 мкл раствора фермента. Раствор субстрата получали так, что конечная концентрация составляла 100 мкМ АТФ/[³³P]АТФ (NEN 10 мкКи/мкл, 3000 Ки/ммоль) и 250 мкМ пептида CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)), разбавленного в киназном буфере, состоящем из 4 мМ MgCl₂, 0,01% TRITON™ X-100, 2 мМ DTT и 20 мМ HEPES. Раствор 20 фермента получали в конечной концентрации фермента 1 нМ CDK7/циклин H/Mat1 [Proqinase 0366-0360-4, серия 002], разбавленного в киназном буфере. Экспериментальные соединения серийно разбавляли 1:3 в 20% ДМСО с получением 10-точечной кривой с исходной концентрацией 20 мкМ. В качестве верхнего контроля использовали чистый 20% буфер ДМСО без экспериментального соединения (полная 25 активность в отсутствие какого-либо ингибитора), 500 мМ ЭДТК использовали для определения уровня фона в отсутствие ферментативной активности (нижний контроль). После смешивания 5 мкл соединений с 10 мкл раствора фермента инкубировали планшет в течение 0 или 180 минут при 22 °С. После указанного времени инициировали реакцию, добавляя 10 мкл раствора субстрата, и инкубировали в течение 50 минут при 22 °С. 30 Останавливали реакцию, добавляя 80 мкл холодного 10% раствора ортофосфорной кислоты. Фильтровальные планшеты (матовые, нестерильные фильтровальные планшеты) предварительно промывали, используя 10 мкл 10% раствора ортофосфорной кислоты в каждой лунке. Переносили 100 мкл смеси на фосфоцеллюлозный фильтр и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут. Промывали фильтровальные планшеты 3 35 раза, используя 200 мкл 0,5% раствора ортофосфорной кислоты, на процессоре

5
10
15
20
25
30
35

фильтровальных планшетов. Внедрение ^{33}P i (подсчет «импульсов в минуту») определяли посредством добавления 80 мкл реагента MICROSCINT™ в каждую лунку и считывания на счетчике через один час. Данные обрабатывали с помощью программного инструмента GENEDATA SCREENER®. Анализировали данные с помощью 4-параметрического нелинейного логистического уравнения (четырепараметрической логистической кривой зависимости ответа от концентрации): $Y = \text{ниж.} + [(\text{верх.} - \text{ниж.}) / (1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{наклон}})]$, где $Y =$ % ингибирование, $X =$ концентрация, обеспечивающая $y\%$ ингибирование, ниж = минимальное значение y , достигнутое кривой, верх. = максимальное значение y , достигнутое кривой, и наклон = крутизна кривой при IC_{50} . %Инг. = $[(\text{медиана Max} - x / \text{медиана Max} - \text{медиана Min})] \cdot 100$

IC_{50} : концентрация соединения, обеспечивающая уменьшение данного ответа (связывания лиганда, ответа фермента) на 50%.

Соединения, описанные в примерах 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8, демонстрируют значения IC_{50} 0,123 мкМ, 0,256 мкМ, 0,155 мкМ, 0,367 мкМ, 0,0674 мкМ, 0,0845 мкМ и 0,0656 мкМ в отношении CDK7 без предварительной инкубации, соответственно. Через 3 часа предварительной инкубации фермента CDK7 с примерами 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 они демонстрируют значения IC_{50} 0,0143 мкМ, 0,0266 мкМ, 0,0143 мкМ, 0,0415 мкМ, 0,00396 мкМ, 0,00625 мкМ и 0,00574 мкМ, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что примеры 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 ингибируют CDK7.

Анализ ингибирования киназной активности CDK9/циклин T1:

Значение IC_{50} активности соединений, описанных в данном документе, определяли с помощью анализов связывания с фильтром с радиоактивной меткой (FB), используя очищенный рекомбинантный фермент человека в присутствии АТФ и пептидного субстрата. Выбранные концентрации АТФ равны или близки к значению K_m фермента для АТФ. Реакции проводили в 96-луночных полистирольных планшетах в конечном объеме 25 мкл на лунку. Смешивали 5 мкл экспериментального соединения в 20% ДМСО, 10 мкл раствора субстрата (АТФ/[^{33}P]АТФ и чередование CDK7/9) и 10 мкл раствора фермента. Раствор субстрата получали так, что конечная концентрация составляла 100 мкМ АТФ/[^{33}P]АТФ (NEN 10 мКи/мкл, 3000 Ки/ммоль) и 200 мкМ пептида CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)), разбавленного в киназном буфере, состоящем из 4 мМ MgCl_2 , 0,0025% TRITON™ X-100, 1,58 мМ DTT и 15,80 мМ HEPES. Раствор фермента получали в конечной концентрации фермента 7,5 нМ CDK9/циклин T1 [Proqinase 0371-0345-1 (серия 004)], разбавленного в киназном буфере. Экспериментальные соединения серийно разбавляли 1:3 в 20% ДМСО с получением 10-

точечной кривой с исходной концентрацией 20 мкМ. В качестве верхнего контроля использовали чистый 20% буфер ДМСО без экспериментального соединения (полная активность в отсутствие какого-либо ингибитора), 500 мМ ЭДТК использовали для определения уровня фона в отсутствие ферментативной активности (нижний контроль).

5 После смешивания 5 мкл соединений с 10 мкл раствора фермента инкубировали планшет в течение 0 или 180 минут при 22 °С. После указанного времени инициировали реакцию, добавляя 10 мкл раствора субстрата, и инкубировали в течение 60 минут при 22 °С. Останавливали реакцию, добавляя 80 мкл холодного 10% раствора ортофосфорной кислоты. Фильтровальные планшеты (матовые, нестерильные фильтровальные планшеты)

10 предварительно промывали, используя 10 мкл 10% раствора ортофосфорной кислоты на лунку. Переносили 100 мкл смеси на фосфоцеллюлозный фильтр и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут. Промывали фильтровальные планшеты 3 раза, используя 200 мкл 0,5% раствора ортофосфорной кислоты, на процессоре фильтровальных планшетов. В каждую лунку добавляли 80 мкл MICROSCINT™ и

15 считывали на сцинтилляционном счетчике через один час. Данные обрабатывали с помощью программного инструмента GENEDATA-SCREENER®. Анализировали данные с помощью 4-параметрического нелинейного логистического уравнения (четырепараметрической логистической кривой зависимости ответа от концентрации): $Y = \text{ниж.} + \frac{[(\text{верх.} - \text{ниж.}) / 1 + (x / IC_{50})^{\text{наклон}}]}$, где $Y = \% \text{ ингибирование}$, $X = \text{концентрация}$, обеспечивающая $y\%$ ингибирование, $\text{ниж.} = \text{минимальное значение } y$, достигнутое кривой, $\text{верх.} = \text{максимальное значение } y$, достигнутое кривой, и $\text{наклон} = \text{крутизна кривой при } IC_{50}$. $\% \text{Инг.} = \frac{[(\text{медиана Max} - x / \text{медиана Max} - \text{медиана Min})]}{1} \cdot 100$. IC_{50} : концентрация соединения, обеспечивающая уменьшение данного ответа (связывания лиганда, ответа фермента) на 50%. Относительная IC_{50} : концентрация, обеспечивающая половину от

25 максимального ответа для данного соединения.

Соединения, описанные в примерах 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8, демонстрируют значения IC_{50} 1,77 мкМ, 3,18 мкМ, 8,05 мкМ, 7,13 мкМ, 1,61 мкМ, 2,03 мкМ и 2,14 мкМ в отношении CDK9 (предварительная инкубация 3 часа), соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что примеры 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 не ингибируют активность CDK9 в

30 значительной степени.

В совокупности, данные, полученные в описанных выше анализах, демонстрируют, что соединения из примеров 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 селективно ингибируют CDK7 по сравнению с CDK9.

Цель представленных анализов заключалась в измерении способности соединений, описанных в данном документе, ингибировать передачу сигналов CDK7 и CDK9 в раковых клетках *in vitro*.

5 **Клеточный анализ Acutem на основе фосфо-карбоксильных концевых доменов (Rbp2) (Ser2) p-CTD (S2)**

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) выращивали в модифицированной среде Мак-Коя 5Å с добавлением 10% FBS, 1% NaPyг и 1% пеницилина/стрептавидина и высевали (до конfluenceности на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 5000
10 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, относительная влажность (ОВ) 95% и 37 °С) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро в клетки вводили дозы соединений. Соединения-ингибиторы сначала сольубилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6% ДМСО. Затем получали серийные разбавления
15 соединений (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Вводили дозы соединений, добавляя 50 мкл из планшета с серийными разбавлениями в аналитический планшет, содержащий прикрепленные клетки, со 100 мкл среды с получением конечной концентрации ДМСО 0,2% с диапазоном конечной концентрации соединений от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2% ДМСО, а для
20 минимальной точки использовали эталонное соединение, разбавленное до конечной концентрации 0,83 мкМ в питательной среде, содержащей 0,2% ДМСО. После введения доз соединений инкубировали клеточные планшеты при 37 °С и 5% CO₂ в течение 4 часов. Осторожно удаляли питательную среду и фиксировали клетки, добавляя 100 мкл 4% параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки однократно
25 промывали PBS и инкубировали со 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для пермеабиллизации клеток. Дважды промывали клетки PBS (каждый раз по 100 мкл) и блокировали, используя 100 мкл на лунку 1% раствора BSA в PBS, в течение 30 минут при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 50 мкл первичного антитела (Anti-phospho CTD Ser2 Abcam, кат. № ab5095-100), разбавленного
30 1:1000 в 1% растворе BSA в PBS, закрывали планшеты и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

На следующий день клетки трижды промывали PBS (100 мкл на лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, козий анти-кроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре.
35 После промывания 3X PBS (100 мкл/лунку) в каждую лунку добавляли 100 мкл 50 мкг/мл

РНказы и иодида пропидия в разведении 1:1000 в PBS. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (защищая от действия света). Анализировали планшеты на Acumen на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный микропланшетный цитометр производства компании TTP LABTECH LTD] для измерения анти-фосфокарбоксильного концевых доменов в серине 2 (pCTD). Анализ изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Клетки, позитивные по pCTD (S2), идентифицировали по средней интенсивности на 500-530 выше порогового значения. Использовали общую интенсивность 575-640 от иодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результатом анализа является % pCTD-позитивных клеток.

Значения IC_{50} определяли посредством подгонки кривой к четырехпараметрическому логистическому уравнению для каждого результата с помощью GENE DATA™. Соединения, описанные в примерах 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8, демонстрируют значения относительной IC_{50} 5,73 мкМ, 6,36 мкМ, 3,71 мкМ, 7,79 мкМ, 3,79 мкМ, 2,92 мкМ и 2,59 мкМ для Phospho-CTD (S2), соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что примеры 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 не ингибируют активность CDK9 в клетках в значительной степени.

20

Клеточный анализ Acumen на основе фосфо-карбоксильных концевых доменов (Rbp2) (Ser5) p-CTD (S5)

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) выращивали в модифицированной среде Мак-Коя 5А с добавлением 10% FBS, 1% NaPyg и 1% пеницилина/стрептавидина и высевали (до конfluence на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 5000 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Инкубировали клетки в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, относительная влажность (ОВ) 95% и 37 °C) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро в клетки вводили дозы соединений. Соединения-ингибиторы солибилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6% ДМСО. Затем получали серийные разбавления соединений (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Вводили дозы соединений, добавляя 50 мкл из планшета с серийными разбавлениями в аналитический планшет, содержащий прикрепленные клетки, со 100 мкл среды с получением конечной концентрации ДМСО 0,2% с диапазоном конечной концентрации соединений от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2% ДМСО, а для минимальной

35

точки использовали эталонное соединение, разбавленное до конечной концентрации 0,83 мкМ в питательной среде, содержащей 0,2% ДМСО. После введения доз соединений инкубировали клеточные планшеты при 37 °С и 5% CO₂ в течение 4 часов. Осторожно удаляли питательную среду и фиксировали клетки, добавляя 100 мкл 4% параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки однократно промывали PBS и инкубировали со 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для пермеабиллизации клеток. Клетки снова дважды промывали PBS (каждый раз по 100 мкл) и блокировали, используя 100 мкл на лунку 1% раствора BSA в PBS, в течение 30 минут при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 50 мкл первичного антитела (Anti-phospho CTD Ser5 Bethyl Laboratories, кат. № A300-655A), разбавленного 1:1000 в 1% растворе BSA в PBS, закрывали планшеты и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

На следующий день клетки трижды промывали PBS (100 мкл на лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, козий анти-кроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания 3X PBS (100 мкл/лунку) в каждую лунку добавляли 100 мкл 50 мкг/мл РНКазы (Sigma) и иодида пропидия в разведении 1:1000 в PBS. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (защищая от действия света). Анализировали планшеты на Acumen на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный микропланшетный цитометр производства компании TTP LABTECH LTD] для измерения анти-фосфокарбоксильного концевых домена в серине 5 (pCTD). Анализ изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Клетки, позитивные по pCTD (S5), идентифицировали по средней интенсивности на 500-530 выше порогового значения. Использовали общую интенсивность 575-640 от иодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результатом анализа является % pCTD-позитивных клеток. Значения IC₅₀ определяли посредством подгонки кривой к четырехпараметрическому логистическому уравнению для каждого результата с помощью GENE DATA™.

Соединения, описанные в примерах 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8, демонстрируют значения относительной IC₅₀ 0,161 мкМ, 0,162 мкМ, 0,0551 мкМ, 0,118 мкМ, 0,0159 мкМ, 0,0717 мкМ и 0,0262 мкМ для pCTD Ser5, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что примеры 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 ингибируют клеточную активность CDK7.

Клеточный анализ Acumen на основе cMyc

Клетки HCT116 (ATCC CCL-247) выращивали в модифицированной среде Мак-Коя 5Å с добавлением 10% FBS, 1% NaPyr и 1% пеницилина/стрептавидина и высевали (до конfluence на 70%) в 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 5000 5 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеточных культур (5% CO₂, относительная влажность (ОВ) 95% и 37 °C) и оставляли для прикрепления к планшету. На следующее утро в клетки вводили дозы соединений. Соединения-ингибиторы солибилизировали при 60 мкМ в культуральной среде, содержащей 0,6% ДМСО. Затем получали серийные разбавления соединений (1:3) в 10 диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Вводили дозы соединений, добавляя 50 мкл из планшета с серийными разбавлениями в аналитический планшет, содержащий прикрепленные клетки, со 100 мкл среды с получением конечной концентрации ДМСО 0,2% с диапазоном конечной концентрации соединений от 20 мкМ до 0,001 мкМ. Для максимальной точки использовали среду, содержащую 0,2% ДМСО, а для минимальной 15 точки использовали эталонное соединение, разбавленное до конечной концентрации 0,83 мкМ в питательной среде, содержащей 0,2% ДМСО. После введения доз соединений инкубировали клеточные планшеты при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Осторожно удаляли питательную среду и фиксировали клетки, добавляя 100 мкл 4% параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки однократно 20 промывали PBS и инкубировали со 100 мкл холодного MeOH в течение 15 минут при комнатной температуре для пермеабилзации клеток. Клетки снова дважды промывали PBS (каждый раз по 100 мкл) и блокировали, используя 100 мкл на лунку 1% раствора BSA в PBS, в течение 30 минут при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 50 мкл первичного антитела (антитело Anti-c-Myc [Y69] Abcam, кат. № ab32072), 25 разбавленного 1:1000 в 1% растворе BSA в PBS, закрывали планшеты и инкубировали в течение ночи при 4 °C. На следующий день клетки трижды промывали PBS (100 мкл на лунку) и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела (разбавление 1:2000, козий анти-кроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания 3X PBS (100 мкл/лунку) в каждую лунку добавляли 100 30 мкл 50 мкг/мл РНКазы и иодида пропидия (Invitrogene) в разведении 1:1000 в PBS. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на рабочем столе (защищая от действия света). Анализировали планшеты на Acumen на FL2 (средняя интенсивность) и FL3 (общая интенсивность). Флуоресцентные планшеты сканировали с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий 35 флуоресцентный микропланшетный цитометр производства компании TTP LABTECH

LTD] для измерения анти-фосфокарбокисильного концевго домена в серине 5 (pCTD). Анализ изображения основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Клетки, позитивные по pCTD (S5), идентифицировали по средней интенсивности на 500-530 выше порогового значения. Использовали общую интенсивность 575-640 от иодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. 5 Результатом анализа является % pCTD-позитивных клеток. Значения IC₅₀ определяли посредством подгонки кривой к четырехпараметрическому логистическому уравнению для каждого результата с помощью GENE DATA™.

Соединения, описанные в примерах 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8, демонстрируют значения 10 относительной IC₅₀ 0,082 мкМ, 0,0947 мкМ, 0,038 мкМ, 0,14 мкМ, 0,00791 мкМ, 0,0138 мкМ и 0,0245 мкМ для cMyc. Полученные данные свидетельствуют о том, что примеры 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 ингибируют транскрипцию cMyc в клетках HCT116.

Эксперимент по профилированию селективности: DiscoverX ScanMax

15 Цель данного исследования заключалась в построении профиля *in vitro* селективности соединения из примера 8. Для измерения селективности соединение из примера 8 испытывали в панели из 468 киназ человека в компании DiscoverX Corporation, используя скрининговую платформу KINOMEscan™. В KINOMEscan™ используется 20 новый и запатентованный анализ конкурентного связывания, специфического в отношении активного сайта, для количественного измерения взаимодействий между экспериментальными соединениями и более чем 450 киназами человека, а также мутантными вариантами, характерными для заболеваний. Для анализов KINOMEscan™ не требуется АТФ и, следовательно, обеспечивают информацию об истинном средстве к 25 термодинамическому взаимодействию, в отличие от значений IC₅₀, которые могут зависеть от концентрации АТФ.

Соединения, связывающие активный сайт киназы и прямо (стерически) или косвенно (аллостерически) предотвращающие связывание киназы с иммобилизованным лигандом, уменьшают количество киназы, захваченной на твердой подложке. Однако молекулы, которые не связываются с киназой, не влияют на количество киназы, захваченной на твердой подложке. Активность соединений отслеживают посредством 30 измерения количества киназы, захваченной в экспериментальном образце, по сравнению с контрольными образцами, используя метод кПЦР, обнаруживающий связанную метку ДНК. Дополнительная информация о скрининговой платформе DiscoverX Corporation KINOMEscan™ представлена на веб-сайте <http://www.discoverx.com>.

Анализы для отслеживания связывания с панелью из 468 киназ проводили в компании DiscoverX[®] Corporation (Фремонт, штат Калифорния). Пример 8 испытывали в конечных концентрациях 20 мкМ, 2 мкМ и 0,2 мкМ. В киназы вводили ДНК-метку для обнаружения методом кПЦР. Магнитные гранулы, покрытые стрептавидином, обрабатывали биотинилированными низкомолекулярными лигандами в течение 30 минут при комнатной температуре для получения аффинных смол для анализов киназы. Связанные с лигандом гранулы блокировали избытком биотина и промывали блокирующим буфером (SeaBlock (Pierce), 1% BSA, 0,05% Tween 20, 1 мМ DTT) для удаления несвязанного лиганда и для уменьшения неспецифического связывания. Реакции связывания осуществляли посредством объединения киназ, связанных с лигандом аффинных гранул и экспериментальных соединений в 1х связывающем буфере (20% SeaBlock, 0,17х PBS, 0,05 % Tween 20, 6 мМ DTT). Экспериментальные соединения получали в виде 40х исходных растворов в 100% ДМСО и разбавляли непосредственно в ходе анализа. Все реакции проводили в полипропиленовых 384-луночных планшетах в конечном объеме 0,02 мл. Аналитические планшеты инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 часа и промывали аффинные гранулы промывочным буфером (1х PBS, 0,05% Tween 20). Затем снова суспендировали гранулы в буфере для элюирования (1х PBS, 0,05% Tween 20, 0,5 мкМ небиотинилированного аффинного лиганда) и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 30 минут. Концентрацию киназы в элюатах измеряли с помощью кПЦР. Результаты первичного скрининга связывающих взаимодействий записывали как «% от контроля», где более низкие значения означают более точные совпадения в матрице.

Расчет % от контроля:

$$\left[\frac{\text{сигнал эксп. соединения} - \text{сигнал полож. контроля}}{\text{сигнал отриц. контроля} - \text{сигнал полож. контроля}} \right] \times 100$$

отрицательный контроль = ДМСО (100% от контроля)

положительный контроль = контрольное соединение (0% от контроля)

Соединение из примера 8 демонстрировало превосходную селективность против панели из 468 протеинкиназ. CDK7 была единственной киназой, демонстрирующей активность менее 35% от контроля в концентрации 0,2 мкМ соединения из примера 8. В частности, соединение из примера 8 демонстрировало активность, составляющую приблизительно 4% от контроля (т.е. примерно 96% ингибирование) против CDK7.

Анализ клеточной пролиферации

Данные в таблице 1 демонстрируют, что соединение из примера 1 ингибирует пролиферацию и жизнеспособность указанных опухолевых клеточных линий. Клеточные линии высевали на планшет с плотностью 5000 клеток на лунку в 100 мкл питательной среды на лунку в белый 96-луночный планшет для клеточных культур. В таблице 1 представлена информация о клеточных линиях и культуральных средах. Инкубировали планшеты при 37 °С и 5% CO₂. На следующий день получали серийные разбавления экспериментального соединения, разбавляя соединение 1:3 в ДМСО в 10 точках. Планшет с ДМСО содержал 1000-кратную конечную концентрацию. В дополнение к ингибитору CDK7, включали колонку с чистым ДМСО в качестве максимального контроля роста и крайнюю колонку с 10 мкМ стауроспорина в качестве максимального контроля ингибирования роста. Затем получали планшет с 10-кратным разбавлением, добавляя 2 мкл на лунку из 1000-кратного планшета с ДМСО к 198 мкл на лунку OMEM (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния, кат. № 31985-070). Клетки обрабатывали указанным соединением, добавляя 11 мкл на лунку из планшета 10X OMEM в клеточный планшет, содержащий 100 мкл на лунку питательной среды, для конечной концентрации 1X. Планшеты помещали обратно в инкубатор при 37 °С и 5% CO₂. Через шесть или семь дней после добавления соединения, для клеток HCC1806 или A2780, соответственно, вынимали планшеты из инкубатора и оставляли для уравнивания до комнатной температуры. Размораживали реагент CELL TITER GLO[®] при комнатной температуре и затем подготавливали, смешивая один флакон аналитического буфера с одним флаконом субстрата, и осторожно взбалтывали для перемешивания. Затем в клеточный планшет добавляли реагент CELL TITER GLO[®] в объеме 100 мкл на лунку и помещали на шейкер Titer Plate с настройкой скорости на 2 на 15 минут при комнатной температуре. Через 15 минут инкубации на шейкере считывали люминесценцию, 1 секунда на лунку, используя Wallac VICTOR2[™]. Для расчета полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) использовали кривую нелинейной регрессии и сигмоидальную кривую зависимости ответа от дозы в программном обеспечении Graphpad Prism 6.

Таблица 1: Ингибирование раковых клеточных линий соединением из примера 1

Клеточная линия	Гистология	IC ₅₀ (мкМ)	Номер по каталогу	Информация о среде
HCC1806	Рак молочной железы	0,01948	ATCC № CRL-2335	RPMI 1640 с HEPES и L-глутамином (Gibco 22400) + 10% FBS (Gibco кат. №10082)

A2780	Рак яичника	0,0228	ATCC № CRL-2772	RPMI 1640 с L-глутамином (Gibco 22400) + 1X NEAA (Corning 25-025-ci) + 10% FBS (Hyclone SH30071.03)
-------	----------------	--------	--------------------	---

Полученные данные демонстрируют, что соединение из примера I ингибирует *in vitro* рост раковых клеточных линий из различных гистологий, включая молочную железу и яичник, дозозависимым образом.

5

Модель ксенотрансплантата опухоли

Цель данного анализа заключалась в измерении уменьшения объема опухоли в ответ на соединение из примера 1. Для оценки эффективности экспериментального соединения *in vivo* использовали несколько моделей ксенотрансплантата опухолей. Вкратце, $2,5 \times 10^6$ опухолевых клеток в смеси 1:1 MATRIGEL® (общий объем 0,2 мл) вводили подкожной инъекцией самкам бестимусных «голых» мышей (Envigo, Harlan Laboratories). После того как опухоли достигали требуемого размера ~300–500 мм³, животных рандомизировали на группы по 5 для исследований эффективности. Экспериментальное соединение вводили через желудочный зонд (РО) в указанных дозах и схемах. Рост опухоли и массу тела контролировали в зависимости от времени для оценки эффективности и признаков токсичности.

Экспериментальное соединение составляли в композицию с 1% гидроксипропилцеллюлозы, 0,25% полисорбата 80, 0,05% пеногасителя в очищенной воде (НЕС) и вводили через желудочный зонд (конечный объем 0,2 мл) в дозах, указанных в таблице 2. Экспериментальное соединение составляли в композицию один раз в неделю и хранили при 4 °С. Контрольным группам вводили несущие среды в соответствии с графиками, описанными выше, используя объем 0,2 мл на дозу. Мышам вводили дозу через желудочный зонд, а в конце собирали образцы опухоли и хранили при -80 °С.

Размер опухоли и массу тела записывали и анализировали один раз в две недели.

Соединение из примера 1 демонстрировало существенную противоопухолевую активность в модели ксенотрансплантата рака человека (таблица 2).

Таблица 2: Обобщение эффективности монотерапии соединения из примера 1 *in vivo* (ΔT/C) в модели ксенотрансплантата опухолей HCC1806, протестированных при различных уровнях дозы, указанных ниже.

Модель	Гистология	Мутации	Доза примера 1 (мг/кг)	График	Ср. ΔT/C
HCC1806	молочная железа	KMT2C	10	QDx28	16,5
HCC1806	молочная железа	KMT2C	20	QDx28	-38,0

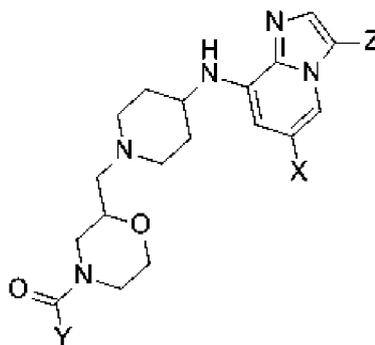
Значения дельта T/C% рассчитывали, когда конечный объем опухоли в экспериментальной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли.

5 Использовали формулу $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$. Здесь T и C представляют собой средние конечные объемы опухоли в экспериментальной или контрольной группе, соответственно. T₀ и C₀ представляют собой средние исходные объемы опухоли в указанных группах.

Несмотря на то, что в данном документе специально описаны лишь некоторые иллюстративные соединения, материалы и стадии способов, другие комбинации
10 указанных соединений, материалов и стадий способов также считаются входящими в объем прилагаемой формулы изобретения, даже если они не упомянуты в отдельности. Таким образом, комбинации стадий, элементов, компонентов или составляющих могут быть упомянуты в данном документе в явном виде; однако включены и другие комбинации стадий, элементов, компонентов и составляющих, даже если они не указаны в
15 явном виде. Термин «содержит» и его варианты в данном контексте использованы как синоним термина «включает» и его вариантов, и они являются открытыми, неограничивающими терминами. Несмотря на то, что термины «содержит» и «включает» использованы в данном документе для описания различных вариантов реализации, термины «состоит по существу из» и «состоит из» могут быть использованы вместо
20 «содержит» и «включает» для обеспечения более конкретных вариантов реализации данного изобретения, и они также считаются описанными.

Формула изобретения:

1. Соединение формулы:



где

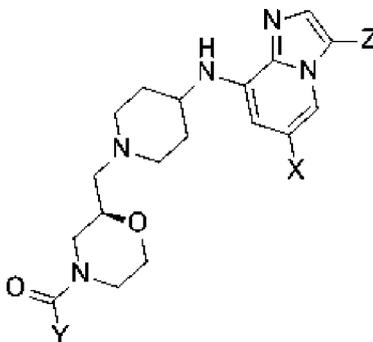
X представляет собой $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CHFCH}_3$, $-\text{CF}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CF}_3$;

Y представляет собой $-\text{CH}=\text{CH}_2$ или $-\text{C}^2\text{H}=\text{C}^2\text{H}_2$; и

Z представляет собой $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ или $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2^2\text{H})$;

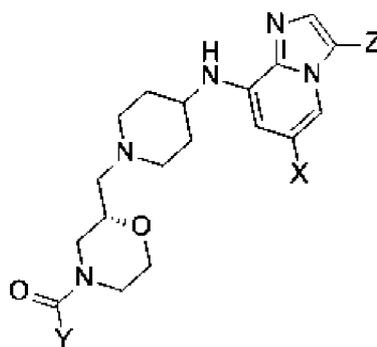
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой



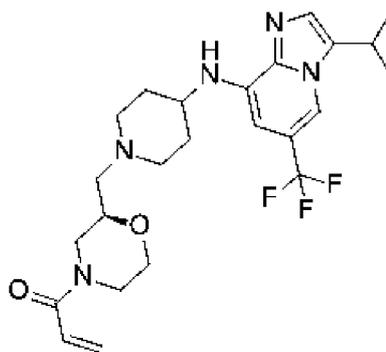
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой



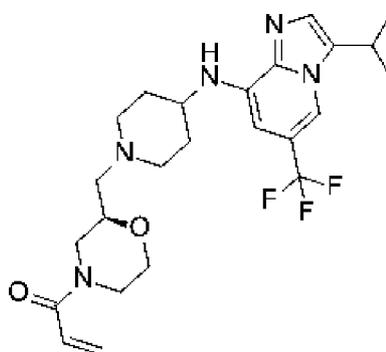
или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой

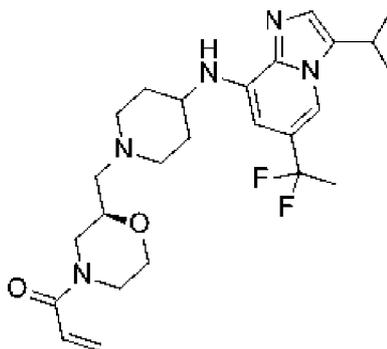


или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой

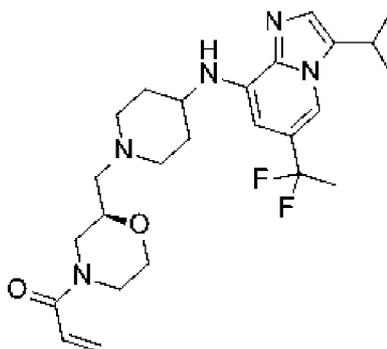


6. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой



8. Соединение по любому из пп. 1-4 или 6, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемая соль представляет собой гидрохлоридную соль.
9. Соединение по любому из пп. 1-4 или 6, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемая соль представляет собой сульфатную соль.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

11. Способ лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-9 или его фармацевтически приемлемой соли.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка.
13. Способ по п. 11 или 12, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.
14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологический образец, полученный от пациента, содержит по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*.
15. Способ по п. 11, отличающийся тем, что пациент выбран для лечения, если тесты биологического образца, полученного от пациента, являются позитивными в отношении по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*.
16. Соединение или его соль по любому из пп. 1-9 для применения в терапии.
17. Соединение или его соль по любому из пп. 1-9 для лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом.
18. Соединение или его соль для применения по п. 17, отличающиеся тем, что рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

19. Соединение или его соль для применения по п. 17 или 18, отличающиеся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.
20. Соединение или его соль для применения по любому из пп. 17-19, отличающиеся тем, что указанное соединение вводят пациенту, имеющему по меньшей мере одну инактивирующую мутацию в генах *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* или *RBI*, обнаруженную при осуществлении *in vitro* анализа с использованием биологического образца, полученного от пациента.
21. Применение соединения по любому из пп. 1-9 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения уротелиального рака, рака матки, колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака желудка, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака предстательной железы, гематологических раковых заболеваний, сарком, рака кожи или глиом.
22. Применение по п. 21, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника или рака желудка.