

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293182 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.16

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.04

(54) ИНГИБИТОРЫ CDK

(31) PCT/CN2020/088585

(32) 2020.05.05

(33) CN

(86) PCT/US2021/030728

(87) WO 2021/226140 2021.11.11

(71) Заявитель:

ЦИЛУ РЕГОР ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.  
(CN)

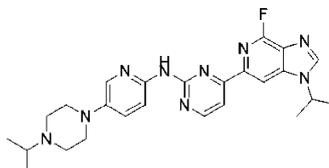
(72) Изобретатель:

Ху Чжилун, Хэ Ху, Чжан Фэй (CN),  
Чжун Вэнэ, Чжу Сяотянь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложено соединение, представленное следующей структурной формулой (I)



или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер, подходящие для применения для лечения рака.

A1

202293182

202293182

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576739EA/032

### ИНГИБИТОРЫ CDK

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета на основании международной патентной заявки PCT/CN2020/088585, поданной 5 мая 2020 года. Полное содержание вышеупомянутой заявки включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклинзависимые киназы (Cyclin-Dependent Kinases, CDK) представляют собой семейство протеинкиназ, которые были впервые обнаружены в связи с их ролью в регуляции клеточного цикла. С тех пор было установлено, что они играют роль в регулировании ряда других биологических функций, таких как транскрипция, процессинг мРНК и дифференцировка нервных клеток.

CDK представляют собой относительно небольшие белки с молекулярной массой примерно 34-40 кДа. Они в основном состоят из киназного домена и по существу неактивны, когда не находятся в комплексе с классом регуляторных белков, называемых циклинами. Уровни CDK остаются относительно постоянными на протяжении всего клеточного цикла, и большая часть их регуляции является посттрансляционной, в первую очередь за счет связывания с циклинами.

Как и у всех киназ, активный сайт, или сайт связывания АТФ, CDK представляет собой щель между небольшой долей на амино-конце и большей долей на карбокси-конце. Структура CDK2 человека показала, что CDK имеют модифицированный сайт связывания АТФ, который может регулироваться посредством связывания с циклином. Фосфорилирование CDK-активирующей киназой (CAK) по Thr 161 на T-петле увеличивает активность комплекса. Без циклина гибкая петля, называемая петлей активации или T-петлей, блокирует щель, и положение нескольких ключевых аминокислотных остатков не является оптимальным для связывания АТФ. С циклином две альфа-спирали меняют положение, позволяя обеспечить связывание АТФ. Одна из них, спираль L12, которая идет непосредственно перед T-петлей в первичной последовательности, становится бета-цепью и помогает перестроить T-петлю, так что она больше не блокирует активный сайт. Другая альфа-спираль, называемая спиралью PSTAIRE, перестраивает и помогает изменить положение ключевых аминокислотных остатков в активном сайте.

Таким образом, только комплекс циклин-CDK обладает действующей киназной активностью, и большинство известных комплексов циклин-CDK регулируют прохождение через клеточный цикл. CDK распространены повсеместно у всех известных эукариот, и их регуляторная функция в клеточном цикле является эволюционно консервативной. Например, дрожжевые клетки могут нормально пролиферировать, если их ген CDK заменен гомологичным геном человека. CDK осуществляют свою

регуляторную функцию, фосфорилируя свои субстраты по определенным специфическим остаткам серина и треонина и консенсусной последовательности [S/T]PX[K/R], где S/T является мишенью Ser или Thr для фосфорилирования, P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту, K представляет собой лизин, и R представляет собой аргинин.

В клетках животных имеется по меньшей мере девять различных CDK, четыре из которых (CDK1, 2, 3 и 4) непосредственно участвуют в регуляции клеточного цикла. В клетках млекопитающих CDK1 и его партнеры по связыванию циклин A2 и B1 сами по себе могут управлять клеточным циклом. Комплексы циклин-CDK на более ранней фазе клеточного цикла могут помочь активировать комплексы циклин-CDK на более поздней фазе.

Одна и та же CDK может образовывать комплексы с различными циклинами для регулирования разных фаз клеточного цикла. Например, CDK2 может образовывать комплекс с циклином D или E для регулирования фазы G1; образовывать комплекс с циклином A или E для регулирования фазы S; и образовывать комплекс с циклином A для регулирования фазы G2. В то же время CDK4 и CDK6 могут образовывать комплексы с циклинами D1, D2 и D3.

Высокоомологичные циклин-зависимые киназы (CDK) CDK4 и CDK6 в комбинации с циклином D являются ключевыми регуляторами перехода через точку рестрикции R между фазами G1 (рост) и S (репликация ДНК) клеточного цикла. CDK4/6 оказывают свое действие посредством фосфорилирования белка ретинобластомы (pRb). После фосфорилирования pRb теряет свое ингибирующее действие на транскрипцию генов, способствующих вхождению в S-фазу.

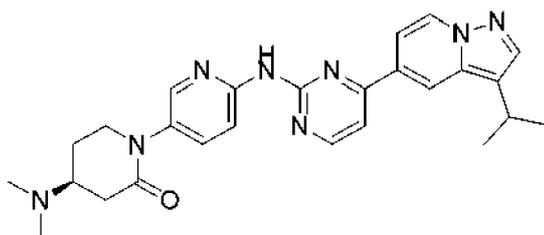
Напротив, специфическое ингибирование активности киназы CDK4/6 эндогенным модулятором белка p16<sup>INK4</sup> или низкомолекулярными ингибиторами приводит к гипофосфорилированному pRb и остановке клеток в точке рестрикции G1. В качестве основного механизма регуляции точки рестрикции G1 путь, регулируемый этими киназами, изменяется в широком спектре опухолей человека, и, таким образом, ингибирование CDK4/CDK6 в этих опухолях имеет терапевтический эффект, предотвращая деление клеток.

Сохраняется потребность в обеспечении ингибиторов CDK4/6, которые можно применять для лечения нарушений пролиферации клеток, таких как рак.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

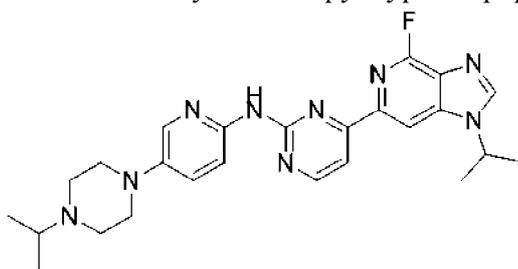
В настоящем документе описаны соединения, которые ингибируют активность циклинзависимой киназы (CDK), например, CDK2, CDK4 и/или CDK6, и их фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, представленное следующей структурной формулой:



(Соединение А) или его фармацевтически приемлемая соль. Обнаружено, что Соединение А не только активно ингибирует CDK2, CDK4 и CDK6, но также демонстрирует сильную антипролиферативную активность.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено соединение, представленное следующей структурной формулой:



(Соединение В) или его фармацевтически приемлемая соль. Обнаружено, что Соединение В избирательно ингибирует CDK4, но также превосходно проникает в головной мозг.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие соединения, раскрытые в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем документе дополнительно предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества (1) соединения, раскрытого в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера; или (2) фармацевтически приемлемой композиции, содержащей соединение, раскрытое в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака молочной железы (такого как гормон-рецептор-положительный, HER2/neu-отрицательный распространенный или метастатический рак молочной железы у женщин в постменопаузе), рака легкого, рака предстательной железы, глиобластомы, лимфомы из клеток мантии, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза.

В некоторых вариантах реализации способов согласно настоящему изобретению рак можно лечить путем ингибирования активности циклин-зависимой киназы (CDK), например, CDK2, CDK4 и/или CDK6.

В некоторых вариантах реализации способов согласно настоящему изобретению рак представляет собой карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, эпидермиса, печени, легкого, пищевода, желчного пузыря, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, носа, головы и шеи, предстательной железы или кожи; гематопозитическую опухоль лимфоидной линии;

гематопоэтическую опухоль миелоидной линии; фолликулярный рак щитовидной железы; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; меланому; семеному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксеродерму; кератоакантому; фолликулярный рак щитовидной железы; или саркому Капоши.

В некоторых вариантах реализации способов согласно настоящему изобретению соединения, раскрытые в настоящем документе, вводят с любым из описанных в настоящем документе вторых терапевтических агентов, которые также лечат тот же вид рака.

В настоящем изобретении также предложено применение соединения, раскрытого в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера, или фармацевтической композиции, содержащей их, в любом из способов согласно настоящему изобретению, описанных выше. В одном варианте реализации предложено соединение, раскрытое в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер, или фармацевтическая композиция, содержащая их, для применения в любом из способов согласно настоящему изобретению, описанных выше. В другом варианте реализации предложено применение соединения, раскрытого в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера, или фармацевтической композиции, содержащей их, для получения лекарственного средства для любого из описанных способов согласно настоящему изобретению.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### *1. Обзор*

В настоящем изобретении предложено соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии, такой как терапия рака.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическому составу, содержащему соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В настоящем изобретении предложено соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении рака. В частности, указанные раковые заболевания могут представлять собой любое из раковых заболеваний, описанных ниже в настоящем документе, таких как колоректальный рак, рак молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), рак легкого, особенно немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак предстательной железы, глиобластома, лимфома из клеток мантии (MCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) и острый миелоидный лейкоз (AML).

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, рака молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup>

распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), рака легкого, особенно немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, глиобластомы, лимфомы из клеток мантии, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения рака. В частности, указанные раковые заболевания выбраны из группы, состоящей из колоректального рака, рака молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), рака легкого, особенно немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, глиобластомы, лимфомы из клеток мантии, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен фармацевтический состав для применения в терапии, содержащий соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В настоящем изобретении также предложен фармацевтический состав для лечения колоректального рака, рака молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), рака легкого, особенно немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, глиобластомы, лимфомы из клеток мантии, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза, причем указанный состав содержит соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Показания к лечению заболевания и потенциальный второй терапевтический агент, применимый для комбинированной терапии, более подробно описаны в разделах ниже.

Следует понимать, что любой вариант реализации, описанный в настоящем документе, включая описанные только в одном из разделов ниже или только в примерах, может быть объединен с любым одним или более дополнительными вариантами реализации изобретения, за исключением случаев, когда это явно не оговорено или иным образом неправомерно/неприменимо.

## *2. Определения*

Соединения, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более центров асимметрии и, таким образом, могут существовать в различных стереоизомерных формах, таких как энантиомеры и/или диастереомеры. Например, соединения, описанные в настоящем документе, могут находиться в форме отдельного энантиомера,

диастереомера или геометрического изомера или могут находиться в форме смеси стереоизомеров, включая рацемические смеси и смеси, обогащенные одним или более стереоизомерами.

Смеси энантиомеров и диастереомеров могут быть разделены на составляющие их энантиомеры или стереоизомеры хорошо известными способами, такими как газовая хроматография на хиральной фазе, высокоэффективная жидкостная хроматография на хиральной фазе, кристаллизация соединения в виде хирального солевого комплекса или кристаллизация соединения в хиральном растворителе. Энантиомеры и диастереомеры также могут быть получены с использованием диастереомерно или энантиомерно чистых промежуточных соединений, реагентов и катализаторов хорошо известными способами асимметричного синтеза. См., например, Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); и Wilen, S.H. *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions*, стр. 268 (EL Eliel, Ed., Univ. Of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

Если соединение обозначено при помощи названия или структуры, которые относятся к одному энантиомеру, то, если не указано иное, указанное соединение имеет оптическую чистоту по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9% (его также называют «энантиомерно чистым»). Оптическая чистота представляет собой отношение массы в смеси обозначенного при помощи названия или изображенного энантиомера к общей массе в смеси обоих энантиомеров.

Следует понимать, что если стереохимия описанного соединения обозначена при помощи названия или изображена при помощи структуры, и обозначенная при помощи названия или изображенная структура включает более чем один стереоизомер (например, в случае пары диастереомеров), то включены один из описанных стереоизомеров или любая смесь описанных стереоизомеров. Кроме того, следует понимать, что стереоизомерная чистота обозначенных при помощи названия или изображенных стереоизомеров составляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9% по массе. Стереоизомерная чистота в данном случае определяется отношением общей массы в смеси обозначенных при помощи названия или структуры стереоизомеров к общей массе в смеси всех стереоизомеров.

Следует понимать, что если геометрический изомер обозначен при помощи названия или структуры, то изомерная чистота обозначенного при помощи названия или изображенного геометрического изомера составляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9% по массе. Чистота геометрического изомера определяется отношением массы обозначенного при помощи названия или изображенного геометрического изомера в смеси к общей массе обоих геометрических изомеров в смеси.

Рацемическая смесь обозначает наличие 50% одного энантиомера и 50% соответствующего другого энантиомера. В настоящее изобретение включены все энантиомерно чистые, энантиомерно обогащенные, диастереомерно чистые,

диастеремерно обогащенные и рацемические смеси и диастереомерные смеси соединений согласно настоящему изобретению.

Соединения, описанные в настоящем документе, также могут включать все изотопы атомов, встречающиеся в промежуточных соединениях или конечных соединениях. Изотопы включают атомы, имеющие одинаковый атомный номер, но разные массовые числа. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий.

Следует понимать, что в синтезируемом соединении происходит некоторое изменение естественного изотопного содержания в зависимости от происхождения химических материалов, используемых в синтезе. Таким образом, препарат соединения, описанного в настоящем документе, будет по своей сути содержать небольшие количества дейтерированных изотопологов. Несмотря на это изменение, концентрация стабильных изотопов водорода и углерода в природе невелика и незначительна по сравнению со степенью стабильного изотопного замещения в соединениях согласно настоящему изобретению. См., например, Wada, E et al., *Seikagaku*, 1994, 66:15; Gannes, LZ et al., *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol*, 1998, 119:725.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут существовать в различных таутомерных формах. Термин «таутомеры» или «таутомерный» относится к двум или более взаимопревращаемым соединениям/ заместителям, возникающим в результате по меньшей мере одной формальной миграции атома водорода и по меньшей мере одного изменения валентности (например, одинарная связь в двойную связь, тройная связь в одинарную связь или наоборот). Примеры таутомеризации включают таутомеризацию кето-енола, амида-имида, лактама-лактима, енамина-имида и енамина-(другого енамина). Настоящие идеи охватывают соединения в форме таутомеров, которые включают формы, не изображенные структурно. Все такие изомерные формы таких соединений включены в явном виде. Если таутомер соединения является ароматическим, такое соединение является ароматическим. Аналогичным образом, если таутомер соединения представляет собой гетероарил, такое соединение представляет собой гетероарил.

В некоторых случаях существуют таутомерные формы описанных в настоящем документе соединений, такие как таутомерные структуры, показанные ниже:



Следует понимать, что когда соединение в настоящем документе представлено структурной формулой или обозначено химическим названием, все другие таутомерные формы, которые могут существовать для указанного соединения, охвачены указанной структурной формулой.

Соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в свободной форме для лечения или, при необходимости, в форме фармацевтически приемлемой соли.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к таким солям, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для применения в контакте с

тканями человека и животных, не обладают чрезмерной токсичностью, не вызывают раздражения, аллергической реакции и тому подобного, и обладают адекватным коэффициентом соотношения риска/пользы. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области, например, Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, известных в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфарат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, соли валериановой кислоты и подобные. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, соли аммония и соли  $N^+(C_{1-4} \text{ алкила})_4^-$ . Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и подобные. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот и обычная методика их получения хорошо известны в данной области. См., например, Stahl et al., *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); Bighley et al., в "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology." Eds. Swarbrick and Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499; Berge et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(1): 1977.

Термины «композиция» и «состав» используются взаимозаменяемо.

«Субъект» представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, но также может представлять собой животное, нуждающееся в ветеринарном лечении,

например, домашних животных (например, собак, кошек и подобных), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и подобных) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок и подобных).

Термин «вводить» или «введение» относится к способам введения соединения согласно настоящему изобретению или его композиции субъекту или на него. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, внутрисуставные (в суставы), внутривенные, внутримышечные, внутриопухолевые, внутрикожные, внутрибрюшинные, подкожные, пероральные, местные, интратекальные, ингаляционные, трансдермальные, ректальные и подобные. Способы введения, которые можно применять с агентами и способами, описанными в настоящем документе, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, настоящее издание; Pergamon; и Remington 's, *Pharmaceutical Sciences* (настоящее издание), Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Термины «лечение», «лечить» и «лечащий» относятся к устранению, облегчению или подавлению прогрессирования заболевания, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации лечение может быть назначено после развития или наблюдения одного или нескольких признаков или симптомов заболевания (т.е. терапевтическое лечение). В других вариантах реализации лечение может быть назначено при отсутствии признаков или симптомов заболевания. Например, лечение может быть назначено восприимчивому субъекту до появления симптомов (т.е. профилактическое лечение) (например, с учетом истории симптомов и/или с учетом воздействия патогена). Лечение также можно продолжить после исчезновения симптомов, например, чтобы отсрочить или предотвратить рецидив.

Термины «состояние», «заболевание» и «нарушение» используются взаимозаменяемо.

Как правило, эффективное количество соединения, описанного в настоящем документе, варьируется в зависимости от различных факторов, таких как конкретное лекарственное средство или соединение, фармацевтический состав, путь введения, тип заболевания или нарушения, личность субъекта или реципиента, подвергаемого лечению, и тому подобное, но тем не менее может быть определено обычным образом специалистом в данной области техники. Эффективное количество соединения согласно настоящему изобретению может быть легко определено средним специалистом в данной области техники обычными методами, известными в данной области техники.

Термин «эффективное количество» означает количество при введении субъекту, которое приводит к благоприятным или желаемым результатам, включая клинические результаты, например, ингибирует, подавляет или уменьшает симптомы состояния, подлежащего лечению у субъекта, по сравнению с контролем. Например, эффективное количество может быть введено в виде единичной лекарственной формы (например, от 1 мг до примерно 50 г в сутки, например, от 1 мг до примерно 5 г в сутки).

«Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, эффективное для детектируемого уничтожения или ингибирования роста или

распространения раковых клеток; размера или количества опухолей; или другого показателя уровня, стадии, прогрессирования или тяжести рака. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от биологического вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести заболевания, конкретного противоракового агента, способа его введения, комбинированного лечения с другими видами терапии и подобного.

Общие химические термины, используемые в приведенных выше формулах, имеют свои обычные значения.

В контексте настоящего документа «ч» относится к часу или часам, «мин» относится к минутам, «Cdk» или «CDK» относится к циклин-зависимой киназе, «pRb» относится к белку ретинобластомы, «MCL» относится к лимфоме из клеток мантии, «AML» относится к острому миелоидному лейкозу, «CML» относится к хроническому миелоидному лейкозу, «Wos» относится к N-трет-бутоксикарбонилу, «ЭА» относится к этилацетату, «ДХМ» относится к дихлорметану, «ДМСО» относится к к диметилсульфоксиду, «ДМА» относится к диметилацетамиду, «ТГФ» относится к тетрагидрофурану, «MtBE» относится к метил-трет-бутиловому эфиру, «ТЭА» относится к триэтиламину, «ФБС» относится к фетальной бычьей сыворотке, «ФСБ» относится к к фосфатно-солевому буферу, «БСА» относится к бычьему сывороточному альбумину, «КТ» относится к комнатной температуре, «mrg» означает миллиграмм на килограмм, «po» относится к per os (пероральному), «qd» означает дозировку один раз в день, «ВЭЖХ» означает жидкостную хроматографию высокого давления, «q2d» означает разовую дозу каждые 2 дня, «q2dx10» означает разовую дозу каждые 2 дня, умноженную на 10, «VSMC» относится к клеткам гладкой мускулатуры сосудов и «XRD» относится к дифракции рентгеновских лучей.

### 3. Соединения

Другой аспект настоящего изобретения относится к меченым соединениям согласно настоящему изобретению (радиоактивно-меченым, флуоресцентно-меченым и т.д.), которые могут быть использованы не только в методах визуализации, но также в анализах, как *in vitro*, так и *in vivo*, для локализации и количественного определения CDK в образцах тканей, включая ткани человека, и для идентификации лигандов CDK путем ингибирования связывания меченого соединения. Соответственно, настоящее изобретение включает такие меченые соединения.

Настоящее изобретение дополнительно включает изотопно-меченые соединения согласно настоящему изобретению. «Изотопно» или «радиоактивно меченое» соединение представляет собой соединение согласно настоящему изобретению, в котором один или несколько атомов заменены или замещены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе (т.е., природного происхождения). Подходящие радионуклиды, которые могут быть включены в соединения согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими,  $^2\text{H}$  (также написанные как D для дейтерия),  $^3\text{H}$

(также написанные как T для трития),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  и  $^{131}\text{I}$ . Радионуклид, входящий в состав настоящих радиоактивно меченых соединений, будет зависеть от конкретного применения такого радиоактивно меченого соединения.

Настоящее изобретение может дополнительно включать способы синтеза для включения радиоизотопов в соединения согласно настоящему изобретению. Способы синтеза для включения радиоизотопов в органические соединения хорошо известны в данной области техники, и рядовой специалист в данной области техники легко распознает методы, применимые к соединениям согласно настоящему изобретению.

Меченое соединение согласно настоящему изобретению может быть использовано в скрининговом анализе для идентификации/оценки соединений. Например, недавно синтезированное или идентифицированное соединение (т.е. тестируемое соединение), которое помечено, можно оценить на предмет его способности связываться CDK путем отслеживания изменения его концентрации при контакте с CDK, посредством отслеживания метки. Например, тестируемое соединение (меченое) может быть оценено на предмет его способности снижать связывание другого соединения, которое, как известно, связывается с CDK (т.е. стандартного соединения). Соответственно, способность тестируемого соединения конкурировать со стандартным соединением за связывание с CDK напрямую коррелирует с его аффинностью связывания. И наоборот, в некоторых других скрининговых анализах стандартное соединение является меченым, а тестируемые соединения являются немечеными. Соответственно, концентрацию меченого стандартного соединения отслеживают, чтобы оценить конкуренцию между стандартным соединением и тестируемым соединением, и таким образом устанавливают относительную аффинность связывания тестируемого соединения.

В одном варианте осуществления реализации соединения или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер, где один или несколько атомов водорода заменены дейтерием.

#### *4. Заболевания, поддающиеся лечению, и способ лечения*

Некоторые соединения согласно настоящему изобретению являются селективными ингибиторами CDK2, CDK4 и/или CDK6 и, следовательно, применимы для лечения заболевания или нарушения, характеризующегося аномальной пролиферацией клеток, которая может быть ингибирована сниженной активностью комплексов CDK-циклин, включающих CDK2, CDK4 и/или CDK6.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению избирательно ингибируют CDK4/6 по сравнению с CDK2, при этом отношение значений  $\text{IC}_{50}$  для последнего (CDK2) к первому (CDK4/6) составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800, 1000, 2000 или более.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению избирательно ингибируют CDK4 по сравнению с CDK6, при этом отношение значений  $\text{IC}_{50}$  для последнего (CDK6) к первому (CDK4) составляет по меньшей мере примерно 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50 или более.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению избирательно ингибируют CDK2 по сравнению с CDK4, при этом отношение значений  $IC_{50}$  для последнего (CDK4) к первому (CDK2) составляет по меньшей мере примерно 2, 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 80, 100 или больше.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению ингибируют CDK2/4/6 с аналогичными значениями  $IC_{50}$ , например, значениями  $IC_{50}$  в пределах 10-, 5-, 3- или 2-кратных. Такие соединения согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака с амплификацией или повышенной экспрессией циклина D1 или E1 или E2.

CDK2 является каталитической субъединицей комплекса CDK-циклин, активность которого ограничена фазой G1-S клеточного цикла, на которой клетки вырабатывают белки, необходимые для митоза, и реплицируют свою ДНК. CDK2 образует комплекс с циклином E или A. Циклин E связывает фазу CDK2 G1, которая необходима для фазового перехода G1 в S. С другой стороны, связывание CDK2 с циклином A необходимо для прохождения S-фазы.

Хотя CDK2 в основном является несущественным в клеточном цикле нормально функционирующих клеток, он имеет решающее значение для аномальных процессов роста раковых клеток. Сверхэкспрессия циклина E происходит во многих опухолевых клетках, в результате чего клетки становятся зависимыми от CDK2 и циклина E. Аномальная активность циклина E наблюдается при раке молочной железы, легкого, колоректальном раке, раке желудка и костей, а также при лейкозе и лимфоме. Аналогичным образом, аномальная экспрессия циклина A2 ассоциирована с хромосомной нестабильностью и пролиферацией опухоли, в то время как ингибирование приводит к снижению роста опухоли. Таким образом, CDK2 и его партнеры по связыванию циклина представляют собой возможные терапевтические мишени для новых противораковых терапевтических средств. Доклинические модели показали предварительный успех в ограничении роста опухоли, а также наблюдалось снижение побочных эффектов текущих химиотерапевтических препаратов.

Например, Caldon et al. (*Mol Cancer Ther* 11 (7): 1488-1499, 2012) сообщили, что циклин E2 включен в несколько профилей экспрессии генов, которые предсказывают прогрессирование заболевания при резистентном к тамоксифену или метастатическом раке молочной железы, а высокая экспрессия  $CycE2$  была характерна для люминального B-подобного и HER2 подтипов рака молочной железы, и была сильным прогностическим фактором более короткой выживаемости без отдаленных метастазов после эндокринной терапии. Кроме того, клетки рака молочной железы, резистентные к тамоксифену (MCF-7 TAMR), сверхэкспрессировали циклин E2; и экспрессия циклина E1 либо E2 в клетках рака молочной железы T-47D придавала острую антиэстрогенную резистентность, что позволяет предположить, что сверхэкспрессия циклина E способствует антиэстрогенной резистентности клеток, резистентных к тамоксифену. Пролиферация резистентных к

тамоксифену клеток ингибировалась РНКи-опосредованным нокдауном циклина E1, циклина E2 или CDK2. Кроме того, эктопическая экспрессия циклина E1 или E2 также снижала чувствительность к ингибированию CDK4, но не CDK2. К тому же, ингибирование CDK2 клеток, сверхэкспрессирующих E-циклин, и клеток, резистентных к тамоксифену, восстанавливало чувствительность к тамоксифену или ингибированию CDK4.

Эти данные демонстрируют, что сверхэкспрессия циклина E2 является потенциальным механизмом резистентности как к эндокринной терапии, так и к ингибированию CDK4, а ингибиторы CDK2 могут, в свою очередь, преодолевать такую резистентность и могут быть полезными в качестве компонента комбинированной терапии при эндокринно-резистентных заболеваниях, поскольку они эффективно ингибируют сверхэкспрессию циклина E1 и E2 в клетках и повышают эффективность других терапевтических средств. Аналогичным образом, ожидается, что рассматриваемые соединения, обладающие мощной ингибирующей активностью в отношении как CDK2, так и CDK4, будут эффективны против раковых клеток, которые являются как нерезистентными, так и резистентными к эндокринной терапии или ингибированию CDK4.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению могут обладать сильным ингибирующим действием в отношении как CDK2, так и CDK4 (например, независимо  $<10$  нМ,  $<5$  нМ,  $<1$  нМ уровня значений  $IC_{50}$ ), и, таким образом, эффективны для лечения резистентного к тамоксифену или метастатического рака молочной железы, такого как резистентный к тамоксифену или метастатический рак молочной железы со сверхэкспрессией CysE.

Значения  $IC_{50}$  соединений согласно настоящему изобретению против CDK2/4/6 можно измерить, например, с помощью способов, описанных в Примерах 1-3 (включенных в настоящий документ посредством ссылки).

В частности, соединения согласно настоящему изобретению могут быть применены при лечении рака. В других вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению пригодны для лечения хронических воспалительных заболеваний, таких как артрит и муковисцидоз.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, в частности рака, описанного в настоящем документе, у млекопитающего, включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

В родственном аспекте настоящее изобретение направлено на применение соединения согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения рака, в частности рака, описанного в настоящем документе.

В другом родственном аспекте соединения согласно настоящему изобретению могут быть использованы для получения лекарственного средства для лечения рака, в частности, рака, описанного в настоящем документе.

В другом родственном аспекте настоящего изобретения предложено соединение согласно настоящему изобретению для применения при лечении рака, в частности, рака, описанного в настоящем документе.

В соответствии с любым из вышеперечисленных родственных аспектов настоящего изобретения CDK4 и CDK6 могут модулировать свои эффекты на клеточный цикл частично посредством фосфорилирования pRb. Таким образом, некоторые соединения согласно настоящему изобретению могут ингибировать фосфорилирование pRb посредством ингибирования активности CDK4/6 и, таким образом, ингибирования пролиферации клеток и/или роста опухоли при любом типе рака, при котором клетки пролиферируют и содержат функциональный интактный ген Rb1, кодирующий pRb.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению пригодны для лечения рака pRb<sup>+</sup>, такого как колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (Fry et al., *Mol. Cancer Ther.* 3(11):1427, 2004), лимфома из клеток мантии (Marzec et al., *Blood* 108(5):1744, 2006), рак яичника (Kim et al., *Cancer Research* 54:605, 1994), рак поджелудочной железы (Schutte et al., *Cancer Research* 57:3126, 1997), злокачественная меланома и метастатическая злокачественная меланома (Maeldansmo et al., *British Journal of Cancer* 73:909, 1996) у млекопитающих. Также ожидается, что соединения согласно настоящему изобретению могут быть применены при лечении рабдомиосаркомы (Saab et al., *Mol. Cancer Ther.* 5(5):1299, 2006) и множественной миеломы (Vaughn et al., *Cancer Res.* 66(15):7661, 2006), включая рецидивирующую рефрактерную множественную миелому у млекопитающих (например, человека).

Между тем, Zhang et al. ([Nature dx.doi.org/10.1038/nature25015](https://doi.org/10.1038/nature25015), 2017) сообщили, что ингибирование CDK4/6 *in vivo* может привести к снижению фосфорилирования и, следовательно, к усилению деградации лигазы Cullin 3<sup>SPOP</sup> E3 (с помощью APC/C<sup>Cdh1</sup>), что, в свою очередь, приводит к повышению уровней PD-L1 на поверхности опухолевых клеток и снижению количества опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в опухолях мыши и в образцах первичного рака предстательной железы человека. Другими словами, ингибирование CDK4/6 *in vivo* повышает уровни белка PD-L1 и способствует повышению устойчивости к терапии иммунными контрольными точками, нацеленной на PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток 1) и PD-L1 (лиганд для PD-1). С другой стороны, сочетание лечения ингибитором CDK4/6 с иммунотерапией против PD-1 усиливает регрессию опухоли и значительно улучшает общую выживаемость в моделях опухолей на мышах.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек PD-1/PD-L1 для повышения терапевтической эффективности в отношении рака у человека.

Ингибиторы PD-1 и PD-L1, которые можно применять с соединениями согласно

настоящему изобретению, известны в данной области техники. Ингибиторы PD-1 включают моноклональные антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, специфичные для PD-1. Примеры ингибиторов PD-1 включают пембролизумаб (Кейтруда), ниволумаб (Опдиво) и цемиплимаб (Либтайо). Ингибиторы PD-L1 включают моноклональные антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, специфичные для PD-L1. Примеры ингибиторов PD-L1 включают атезолизумаб (Тецентрик), авелумаб (Бавенсио) и дурвалумаб (Имфинзи).

Дополнительный ингибитор иммунных контрольных точек, который можно применять с соединениями согласно настоящему изобретению для повышения терапевтической эффективности при раковых заболеваниях человека, включает моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные для CTLA-4, такие как ипилимумаб (Ервой).

Дополнительный ингибитор иммунных контрольных точек, который можно применять с соединениями согласно настоящему изобретению для повышения терапевтической эффективности при раковых заболеваниях человека, включает биспецифические моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные для PD-1 и PD-L1, или комбинацию моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, специфичных для PD-1 и PD-L1 или PD-1 и CTLA-4 и т.д.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с ингибитором Туг-киназы, например, ингибиторами рецепторной Туг-киназы (RTK), для повышения терапевтической эффективности при раковых заболеваниях человека. Примеры ингибиторов Туг-киназы включают ингибиторы ALK (такие как кризотиниб, церитиниб, алектиниб, бригаиниб), ингибиторы Vcr-Abl (такие как босутиниб, дазатиниб, иматиниб, нилотиниб, понатиниб), ингибитор ВТК (например, ибрутиниб), ингибитор с-Met (например, такие как кризотиниб, кабозантиниб), ингибитор EGFR (например, gefitinib, эрлотиниб, лапатиниб, вандетаниб, афатиниб, осимертиниб), ингибитор JAK (например, руксолитиниб, тофацитиниб), ингибитор MEK1/2 (например, траметиниб), ингибитор PDGFR (например, акситиниб, gefitinib, иматиниб, ленватиниб, нинтеданиб, пазопаниб, регорафениб, сорафениб, сунитиниб), ингибитор RET (например, вандетаниб), ингибиторы киназы семейства Src (например, босутиниб, дазатиниб, понатиниб, вандетаниб) и ингибиторы семейства VEGFR (например, акситиниб, ленватиниб, нинтеданиб, регорафениб, пазопаниб, сорафениб, сунитиниб).

Дополнительные подходящие ингибиторы киназ, которые можно применять в комбинации с рассматриваемыми соединениями, а также показания для лечения рака описаны в Bhullar et al. , *Molecular Cancer* 17:48, 2018 (полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Дополнительные ингибиторы RTK включают моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включая моноклональные антитела против EGFR, такие

как цетуксимаб (эффективен для лечения, например, рака легкого, колоректального рака и рака головы и шеи), и моноклональные антитела против HER2, такие как трастузумаб (эффективен для лечения, например, рака молочной железы).

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с антагонистом передачи сигналов гормональных рецепторов, таким как описанные ранее для лечения рака молочной железы.

Раковые заболевания, поддающиеся лечению соединениями согласно настоящему изобретению, включают: неходжкинскую лимфому; злокачественную мезотелиому; немелкоклеточный рак легкого; холангиокарциному; саркому мягких тканей; глиобластому; (рецидивирующую) опухоль головного мозга; метастазы в головной мозг, вторичные по отношению к гормон-рецептор-положительному раку молочной железы, немелкоклеточную карциному легкого, меланому (включая меланому, положительную по отношению к экспрессии цикла D1); (рецидивирующий или персистирующий) рак эндометрия; (рецидивирующую или метастатическую) плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC); гепатоцеллюлярную карциному; плоскоклеточную карциному пищевода (ПКР); аденокарциному пищевода (ADC); почечно-клеточную карциному и уротелиальный рак.

В некоторых вариантах реализации раковые заболевания, поддающиеся лечению, включают: карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, эпидермиса, печени, легкого (включая МРЛ и НМРЛ), пищевода, желчного пузыря, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, носа, головы и шеи, предстательной железы или кожи; гематопоэтическую опухоль лимфоидной линии; гематопоэтическую опухоль миелоидной линии; фолликулярный рак щитовидной железы; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; меланому; наследственную меланому; семеному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксеродерму; кератоакантому; фолликулярный рак щитовидной железы; саркому Капоши, плоскоклеточный рак, саркому; или опухоль мезенхимального происхождения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гематопоэтическая опухоль лимфоидной линии представляет собой лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, множественную миелому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, волосатоклеточную лимфому или лимфому Беркетта.

В некоторых вариантах реализации опухоль центральной или периферической нервной системы представляет собой астроцитому, нейробластому, глиому или шванному.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, мультиформную глиобластому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (ALL) и лимфому из клеток мантии.

В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из:

колоректального рака, лимфомы из клеток мантии, рака молочной железы (включая распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы), рака поджелудочной железы, рака яичника, глиобластомы, острого миелоидного лейкоза и рака легкого, особенно НМРЛ.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой НМРЛ, рак поджелудочной железы, рак яичника или метастатический рак молочной железы, и лечение включает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной комбинации соединения согласно настоящему изобретению и гемцитабина HCl.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой НМРЛ, рак поджелудочной железы, рак яичника или метастатический рак молочной железы, где лекарственное средство, содержащее соединение согласно настоящему изобретению, также включает гемцитабин HCl, или его следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с гемцитабином HCl.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими агентами для лечения НМРЛ, рака поджелудочной железы, рака яичника и метастатического рака молочной железы. Например, соединение согласно настоящему изобретению можно применять в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с гемцитабином HCl при лечении НМРЛ, рака поджелудочной железы, рака яичника или метастатического рака молочной железы.

В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, глиобластомы, острого миелоидного лейкоза и рака легкого.

В некоторых вариантах реализации рак представляет собой глиобластому или астроцитому, и для лечения применяют терапевтически эффективную комбинацию согласно настоящему изобретению и темозоломида. Соединение согласно настоящему изобретению можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с темозоломидом.

#### ***Лечение рака молочной железы***

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака молочной железы.

Рак молочной железы представляет собой значительное бремя для здоровья во всем мире, и только на его долю приходилось ~ 7% всех смертей, связанных с раком, в США в 2016 году. Из всех видов рака молочной железы около 75% диагностируются как гормон-рецептор-положительный (HR<sup>+</sup>) рак молочной железы, который экспрессирует рецептор эстрогена (ER) и/или прогестероновый рецептор (PgR) и, как правило, зависит от сигнального пути ER для роста и выживания. То есть, рак молочной железы HR<sup>+</sup> использует биологические функции пути ER для стимулирования роста, развития и прогрессирования рака молочной железы. Между тем, зависимость HR<sup>+</sup> рака молочной железы от передачи сигналов ER сделала такой рак молочной железы терапевтической

мишенью для агентов эндокринной терапии, которые нацелены на сигнальный путь эстрогена, таких как ингибиторы ароматазы (AI; включая летрозол, анастрозол и экземестан), селективные модуляторы ER (тамоксифен) и селективные регуляторы ER (фулвестрант) и другие.

Хотя эндокринная терапия составляет основу лечения HR<sup>+</sup> рака молочной железы, эффективность эндокринной терапии ограничена высокими показателями как ранее существовавшей резистентности *de novo*, так и резистентности, приобретенной во время лечения, из-за наличия альтернативного пути выживания или «эвакуации». Путь ER и многие известные пути эвакуации действуют через путь циклин D-CDK4/6 -ингибитор пути CDK4 (INK4)-ретинобластома (Rb), способствуя росту опухоли. Таким образом, нацеливание как на ER, так и на пути циклина D-CDK4/6-INK4-Rb в комбинации обычно приводит к более обширному ингибированию роста опухоли и предотвращает активацию путей эвакуации, исключая развитие резистентности к эндокринной терапии. См. Sammons et al., *Current Cancer Drug Targets* 17:637-649, 2017.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации рак молочной железы представляет собой рак молочной железы pRb<sup>+</sup>. В некоторых вариантах реализации рак молочной железы представляет собой гормон-рецептор (HR)-положительный (например, положительный по рецептору эстрогена (ER<sup>+</sup>), положительный по рецептору прогестерона (PR<sup>+</sup>) или ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>), HER2/*neu*-отрицательный рак, включая HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> или ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup>, распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы. В некоторых вариантах реализации HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> или ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы встречается у взрослой женщины или женщины в постменопаузе.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению применяют либо отдельно, либо вместе с ингибитором ароматазы (который ингибирует выработку эстрогена) для лечения HR-положительного, HER2-отрицательного распространенного или метастатического или рецидивирующего рака молочной железы. В некоторых вариантах реализации ингибитор ароматазы временно инактивирует ароматазу (например, анастрозол (ARIMIDEX<sup>®</sup>) и летрозол (FEMARA<sup>®</sup>)). В некоторых вариантах реализации ингибитор ароматазы перманентно инактивирует ароматазу (такой как экземестан (AROMASIN<sup>®</sup>)).

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют с соединением, которое препятствует способности эстрогена стимулировать рост клеток рака молочной железы, таким как селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM), который связывается с рецептором эстрогена для предотвращения связывания эстрогена, таким как тамоксифен (NOLVADEX<sup>®</sup>) и торемифен (FARESTON<sup>®</sup>). Тамоксифен более 30 лет используется для лечения рака молочной железы типа HR<sup>+</sup>.

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют с чистым антиэстрогеном, не обладающим активностью агониста

эстрогена, таким как фулвестрант (FASLODEX<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах реализации HR-положительный, HER2-отрицательный распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы встречается у женщины в постменопаузе. В некоторых вариантах реализации HR-положительный, HER2-отрицательный распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы прогрессировал после приема терапии, изменяющей гормоны пациента (например, эстрогена и/или прогестерона), или ухудшился после лечения другой гормональной терапией.

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют у пациента, подвергающегося абляции яичника или перенесшего абляцию яичника. В некоторых вариантах реализации абляцию яичника проводят путем овариэктомии или лучевой терапии.

В некоторых вариантах реализации соединение (-я) согласно настоящему изобретению применяют с соединением, которое временно подавляет функцию яичников (например, выработку эстрогена и/или прогестерона). Такое соединение включает агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH) или агонисты рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LH-RH), включая гозерелин (ZOLADEX<sup>®</sup>) и лейпролид (LUPRON<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют с соединением, которое ингибирует CYP3A4, таким как ритонавир, индинавир, нелфинавир, саквинавир, кларитромицин, телитромицин, хлорамфеникол, кетоконазол, итраконазол, позаконазол, вориконазол, нефазодон, кобицистат, амиодарон, апрепитант, верапамил, дилтиазем, эритромицин, флуконазол, миконазол, бергамоттин, циметидин, ципрофлоксацин, циклоспорин, донедарон, флувоксамин, иматиниб, валериана, бупренорфин, кафестол, цилостазол, фосапрепитант, габапентин, ломитапид, орфенадрин, ранитидин, ранолазин, такролимус, тикагрелор, вальпроевая кислота, амлодипин, каннабидиол, дитиокарбамат, мифепристон, норфлоксацин, делавирдин, гестоден, мибефрадил, карамболы, расторопша пятнистая, ниацинамид, гинкго билоба, пиперин, изониазид и кверцетин.

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют с ингибитором IGF-1/IGF-2, таким как моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против IGF-1/IGF-2. Примеры антител включают ксентузумаб, гуманизованное моноклональное антитело против IgG1.

В некоторых вариантах реализации соединение(-я) согласно настоящему изобретению применяют с соединением, которое ингибирует P13K. Считается, что ингибирование P13K снижает уровни циклина D1 и других циклинов G1-S, отменяет фосфорилирование pRb и ингибирует активацию транскрипционных программ S-фазы. Типичные ингибиторы P13K для применения с соединениями согласно настоящему изобретению включают идедалисиб, копанлисиб, дувелисиб, тазелисиб, перифозин, бупарлисиб, альпелисиб, умбралисиб, копанлисиб, дактолисиб и воксталисиб.

В некоторых вариантах реализации млекопитающее, подлежащее лечению, представляет собой человека, например взрослую женщину, имеющую рак молочной железы (например, женщину в постменопаузе или взрослую женщину, имеющую положительный по рецептору гормона (HR), человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2) -отрицательный распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы, прогрессирующий после приема терапии, которая изменяет гормоны пациента).

Кроме того, некоторые соединения по настоящему изобретению проявляют предпочтительное свойство, заключающееся в том, что они способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Следственно, такие соединения способны проникать в мозг и, таким образом, полезны при лечении первичных и метастатических опухолей головного мозга, при которых клетки пролиферируют и содержат функциональный интактный ген Rb1. Примеры таких pRb<sup>+</sup> опухолей головного мозга включают глиобластому, а также медуллобластому и астроцитому (Lee et al., Science 235:1394, 1987).

Темозоломид представляет собой цитотоксический агент, алкилирующий ДНК, используемый для лечения опухолей головного мозга, включая глиобластому и астроцитому (Friedman et al., Clin. Cancer Res. 6(7):2585-2597, 2000), включая метастазы в головном мозге от меланомы, рака молочной железы и НМРЛ (Siena et al., Annals of Oncology, doi:10.1093/annonc/mdp343, 2009). Темозоломид взаимодействует с ДНК, вызывая ее химическую модификацию/повреждение (Marchesi et al., Pharmacol. Res. 56(4): 275-287, 2007). Таким образом, в некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с темозоломидом для лечения первичных и метастатических pRb<sup>+</sup> опухолей головного мозга, таких как глиобластома и астроцитомы, например, если такие метастазы происходят от меланомы, рака молочной железы или НМРЛ.

##### *5. Фармацевтические композиции*

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, которые содержат любое из соединений, описанных в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

«Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» и «фармацевтически приемлемый носитель» относятся к веществу, которое способствует составлению и/или введению активного агента субъекту и/или его абсорбции субъектом и может быть включено в композиции согласно настоящему изобретению без оказания значительного токсикологического воздействия на субъекта. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей и вспомогательных веществ включают воду, NaCl, физиологические растворы, раствор Рингера с лактатом, нормальную сахарозу, нормальную глюкозу, связующие вещества, наполнители, дезинтегранты, смазки, покрытия, подсластители, ароматизаторы, солевые растворы (например, раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные

эффиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидин и красители, и подобные. Такие препараты можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными агентами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, соли для воздействия на осмотическое давление, буферы, красители и/или ароматические вещества и подобные, которые не вступают в повреждающую реакцию с соединениями, предложенными в настоящем документе, или не препятствуют их активности. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что другие фармацевтические носители и вспомогательные вещества пригодны для применения с описанными соединениями.

Указанные композиции необязательно дополнительно содержат один или более дополнительных терапевтических агентов. В качестве альтернативы соединение согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, в комбинации с введением одной или более других терапевтических схем (например, Gleevec или других ингибиторов киназы, интерферона, трансплантации костного мозга, ингибиторов фарнезилтрансферазы, бисфосфонатов, талидомида, противораковых вакцин, гормональной терапии, антител, радиации и т.д.). Например, дополнительные терапевтические агенты для совместного введения или включения в фармацевтическую композицию с соединением согласно настоящему изобретению могут представлять собой другой один или более противораковых агентов.

Как описано в настоящем документе, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединение согласно настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, который в контексте настоящего документа включает любые возможные растворители, разбавители или другой носитель, дисперсионные или суспензионные добавки, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и подобные, подходящие для конкретной желаемой лекарственной формы. В Remington's Pharmaceutical Sciences, пятнадцатое издание, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1975) раскрыты различные носители, используемые при составлении фармацевтических композиций, и известные способы их получения. За исключением случаев, когда любая обычная среда-носитель несовместима с соединениями согласно настоящему изобретению, например, потому, что вызывает какой-либо нежелательный биологический эффект или иным образом отрицательно взаимодействует с любым другим компонентом (-ами) фармацевтической композиции, предполагается, что ее применение входит в объем настоящего изобретения. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозитория; масла, такие как арахисовое

масло, хлопковое масло; сафлоровое масло; кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такой пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделительные средства, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композиции.

#### *6. Составы*

Настоящее изобретение также охватывает класс композиций, содержащих активные соединения согласно настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или разбавителями и/или адьювантами (в совокупности называемыми в настоящем документе «материалами-носителями») и, при необходимости, другими активными ингредиентами.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический состав для лечения рака, в частности рака, описанного в настоящем документе, содержащий соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический состав для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, лимфомы из клеток мантии, рака молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), глиобластомы, острого миелоидного лейкоза и рака легкого, особенно НМРЛ, причем указанный состав содержит соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический состав для лечения глиобластомы или астроцитомы, содержащий соединение согласно настоящему изобретению и темозоломид вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения также предложен фармацевтический состав, содержащий соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и темозоломид вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический состав для лечения НМРЛ, рака поджелудочной железы, рака яичника или метастатического рака молочной железы (включая ER<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> распространенный или метастатический или рецидивирующий рак молочной железы у взрослой женщины или женщины в постменопаузе), причем указанный состав содержит соединение согласно

настоящему изобретению и гемцитабин HCl вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения также предложен фармацевтический состав, содержащий соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и гемцитабин HCl вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

Активные соединения согласно настоящему изобретению вводят любым подходящим путем, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, предназначенной для указанного пути введения, в дозировке, эффективной для предполагаемого лечения. Соединения и композиции согласно настоящему изобретению можно, например, вводить перорально, через слизистые оболочки, местно, ректально, легочно, например, с помощью ингаляционного спрея, или парентерально, в том числе внутрисосудистым, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, подкожным, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным и инфузионным способами, в стандартных лекарственных формах, содержащих обычные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и несущие среды.

Фармацевтически активные соединения согласно настоящему изобретению могут быть обработаны в соответствии с обычными фармацевтическими методами с получением лекарственных средств для введения пациентам, включая человека и других млекопитающих.

Для перорального введения фармацевтическая композиция может находиться в форме, например, таблетки, капсулы, суспензии или жидкости. Фармацевтическая композиция предпочтительно изготовлена в форме единицы дозирования, содержащей определенное количество активного ингредиента.

Примерами таких единиц дозирования являются таблетки или капсулы. Например, подходящая суточная доза для человека или другого млекопитающего может варьироваться в зависимости от состояния пациента и других факторов, но, опять же, может быть определена с использованием обычных методов.

Количество вводимых соединений и режим дозирования для лечения болезненного состояния с помощью соединений и/или композиций согласно настоящему изобретению зависит от множества факторов, включая возраст, вес, пол и медицинское состояние субъекта, тип заболевания, тяжесть заболевания, путь и частоту введения и конкретное применяемое соединение. Соответственно, схема дозирования может значительно варьировать, однако может быть определена обычным путем с применением стандартных способов. Как упоминалось ранее, суточная доза может быть введена за одно введение или может быть разделена между 2, 3, 4 или более введениями.

Для терапевтических целей активные соединения согласно настоящему изобретению обычно комбинируют с одним или несколькими адъювантами, вспомогательными веществами или носителями, подходящими для указанного пути введения. При пероральном введении соединения могут быть смешаны с лактозой,

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

В случае кожных заболеваний может быть предпочтительным наносить местный препарат соединений согласно настоящему изобретению на пораженный участок два-четыре раза в сутки. Составы, подходящие для местного применения, включают жидкие или полужидкие препараты, подходящие для проникновения через кожу (например, жидкие мази, лосьоны, мази, кремы или пасты) и капли, подходящие для введения в глаз, ухо или нос. Для местного применения активный ингредиент может составлять от 0,001% до 10% масс./масс., например, от 1% до 2% масс. состава, хотя он может содержать до 10% масс./масс., но предпочтительно не более 5% масс./масс. и более предпочтительно от 0,1% до 1% состава.

Соединения согласно настоящему изобретению также можно вводить с помощью трансдермального устройства. Предпочтительно чрескожное введение осуществляют с использованием резервуарного пластыря или пластыря с пористой мембраной, или пластыря из нескольких твердых матриц. В любом случае активный агент доставляется - непрерывно из резервуара или микрокапсул через мембрану в проницаемый для активного агента клей, который находится в контакте с кожей или слизистой оболочкой реципиента. Если активный агент всасывается через кожу, реципиенту вводят контролируемый и заранее определенный поток активного агента. В случае микрокапсул инкапсулирующий агент также может действовать как мембрана. Масляная фаза эмульсий согласно настоящему изобретению может быть получена из известных ингредиентов известным образом.

Хотя фаза может содержать только эмульгатор, она может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом или как с жиром, так и с маслом. Предпочтительно гидрофильный эмульгатор включен вместе с липофильным эмульгатором, который действует как стабилизатор. Также предпочтительно включать как масло, так и жир. Вместе эмульгатор(ы) со стабилизатором (-ами) или без него составляют так называемый эмульгирующий воск, и воск вместе с маслом и жиром составляют так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует маслянистую диспергированную фазу кремовых составов. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии, подходящие для применения в составе согласно настоящему изобретению, включают Tween 60, Span 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, моностеарат глицерина, лаурилсульфат натрия, глицерилдистеарат, отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области техники.

Выбор подходящих масел или жиров для состава основан на достижении желаемых косметических свойств, поскольку растворимость активного соединения в большинстве масел, которые могут использоваться в фармацевтических эмульсионных составах, очень низка. Таким образом, предпочтительно, чтобы крем был нежирным, не оставляющим пятен и смываемым продуктом подходящей консистенции, чтобы избежать его утечки из тюбиков или других контейнеров. Можно применять прямые или разветвленные, моно- или двухосновные алкиловые эфиры, такие как диизоадипинат, изоцетилстеарат, пропиленгликолевый диэфир кокосовых жирных кислот, изопропилмирикат, децилолеат, изопропилпальмитат, бутилстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь эфиров с разветвленной цепью. Их можно использовать по отдельности или в комбинации в зависимости от требуемых свойств.

В качестве альтернативы можно использовать липиды с высокой температурой плавления, такие как белый мягкий парафин и/или жидкий парафин, или другие минеральные масла.

Составы, подходящие для местного введения в глаз, также включают глазные капли, в которых активные ингредиенты растворены или суспендированы в подходящем носителе, особенно в водном растворителе для активных ингредиентов.

Активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в таких составах в концентрации от 0,5 до 20%, предпочтительно от 0,5 до 10% и, в частности, примерно 1,5% масс./масс.

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

Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. К приемлемым носителям и растворителям, которые можно использовать, относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно применяют стерильные нелетучие

масла. Для этой цели можно применять любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при приготовлении препаратов для инъекций.

Для легочного введения фармацевтическую композицию можно вводить в форме аэрозоля или с помощью ингалятора, содержащего аэрозоль сухого порошка.

Суппозитории для ректального введения лекарственного средства могут быть получены путем смешивания лекарственного средства с подходящим не раздражающим вспомогательным веществом, таким как масло какао и полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при обычных температурах, но жидкими при ректальной температуре и, следовательно, расплавляются в прямой кишке и высвобождают лекарство.

Фармацевтические композиции могут быть подвергнуты обычным фармацевтическим операциям, таким как стерилизация, и/или могут содержать обычные адъюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, буферы и т. д. Таблетки и пилюли могут быть дополнительно приготовлены с энтеросолюбильными покрытиями. Такие композиции могут также содержать адъюванты, такие как смачиватели, подсластители, ароматизаторы и отдушки. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат соединение формул, описанных в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль; дополнительный агент, выбранный из ингибитора киназы (низкомолекулярный, полипептидный, антители и т.д.), иммунодепрессанта, противоракового агента, противовирусного агента, противовоспалительного агента, противогрибкового агента, антибиотика или соединения против гиперпролиферации сосудов; и любой фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или несущую среду.

Альтернативные композиции согласно настоящему изобретению содержат соединение формул, описанных в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или несущую среду. Такие композиции могут необязательно содержать один или несколько дополнительных терапевтических агентов, включая, например, агенты, ингибирующие киназу (малые молекулы, полипептиды, антители и т.д.), иммунодепрессанты, противораковые агенты, противовирусные агенты, противовоспалительные агенты, противогрибковые агенты, антибиотики или соединения против гиперпролиферации сосудов.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель или адъювант» относится к носителю или адъюванту, который можно вводить пациенту вместе с соединением согласно настоящему изобретению, и который не нарушает его фармакологическую активность и является нетоксичным при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества соединения. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или несущие среды, которые можно использовать в композициях, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы лекарственной

доставки (SEDDS), такие как д-атокоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических лекарственных формах, такие как Tween или другие сходные полимерные матрицы для доставки, белки сыворотки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и шерстяной жир. Циклодекстрины, такие как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксилалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропилциклодекстрины, или другие солюбилизованные производные также могут быть успешно использованы для улучшения доставки соединений формул, описанных в настоящем документе.

Фармацевтические композиции можно вводить перорально в любой перорально приемлемой стандартной дозированной лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, эмульсии и водные суспензии, дисперсии и растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул подходящие разбавители включают лактозу и сушеный кукурузный крахмал. Когда водные суспензии и/или эмульсии вводят перорально, активный ингредиент может быть суспендирован или растворен в масляной фазе в сочетании с эмульгирующими и/или суспендирующими агентами.

При желании могут быть добавлены определенные подсластители, ароматизаторы и/или красители. Фармацевтические композиции могут включать составы, в которых используются липосомы или методы микрокапсулирования, различные примеры которых известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью назального аэрозоля или путем ингаляции. Такие композиции получают согласно методикам, хорошо известным в области получения фармацевтических составов, и могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для улучшения биодоступности, фторуглеродов и/или других солюбилизирующих или диспергирующих агентов, примеры которых также хорошо известны в данной области техники.

### *7. Наборы для лечения*

Один аспект настоящего изобретения относится к набору для удобного и эффективного осуществления способов или применений в соответствии с настоящим изобретением. Обычно фармацевтическая упаковка или набор включает один или более

контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Такие наборы особенно подходят для доставки твердых пероральных форм, таких как таблетки или капсулы. Такой набор предпочтительно включает в себя ряд единичных доз, а также может включать карточку с дозами, ориентированными в порядке их предполагаемого применения. При желании может быть предоставлена памятка, например, в форме цифр, букв или других обозначений или с календарной вставкой, обозначающей дни в графике лечения, в которые можно вводить дозы. Необязательно, такой контейнер (-ы) может сопровождаться уведомлением в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических продуктов, при этом уведомление отражает разрешение агентства на производство, применение или продажу для введения человеку.

Следующие ниже типичные примеры содержат важную дополнительную информацию, примеры и рекомендации, которые могут быть адаптированы к практическому применению настоящего изобретения в его различных вариантах реализации и их эквивалентах. Указанные примеры предназначены для того, чтобы помочь проиллюстрировать настоящее изобретение, и не предназначены и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Действительно, различные модификации изобретения и многие дополнительные варианты его реализации, в дополнение к тем, которые показаны и описаны в настоящем документе, будут понятны специалистам в данной области техники после ознакомления с настоящим документом, включая приведенные ниже примеры и ссылки на научную и патентную литературу, цитируемую в настоящем документе.

Содержание цитируемых ссылок включено в настоящий документ посредством ссылки, чтобы проиллюстрировать уровень техники.

Кроме того, для целей настоящего изобретения химические элементы определены согласно периодической таблице элементов, версия CAS, Справочник по химии и физике (Handbook of Chemistry and Physics), 75-е изд., внутренняя сторона обложки. Кроме того, общие принципы органической химии, а также конкретные функциональные группы и реакционная способность описаны в «Органической химии», авт. Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 и «Органической химии», авт. Morrison & Boyd (3-е изд.), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### *8. Схемы синтеза*

Соединения Формулы I могут быть получены средним специалистом в данной области техники в соответствии с признанными в данной области техники методиками и способами. Более конкретно, соединения формулы I могут быть получены, как указано в схемах, способах и примерах, изложенных ниже. Специалистам в данной области техники будет понятно, что отдельные этапы в следующих схемах могут варьироваться для получения соединений Формулы I. Реагенты и исходные материалы легко доступны

среднему специалисту в данной области техники. Все заместители, если не указано иное, имеют указанные ранее значения.

## ПРИМЕРЫ

### Примеры синтеза

#### Описание оборудования

$^1\text{H}$  ЯМР-спектры снимали на спектрометре Bruker Ascend 400. Химические сдвиги выражаются в частях на миллион (ppm,  $\delta$  единицы). Константы взаимодействия выражены в герцах (Гц). Паттерны расщепления описывают кажущиеся кратности и обозначаются как s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), quint (квинтет), m (мультиплет), br (широкий).

Аналитические масс-спектры низкого разрешения (МС) записывали на приборе Waters ACQUITY UPLC с детекторами SQ с использованием Waters CORTECS C18+, 2,7 мкм 4,6×30 мм с использованием метода градиентного элюирования.

Растворитель А: 0,1% муравьиной кислоты (FA) в воде.

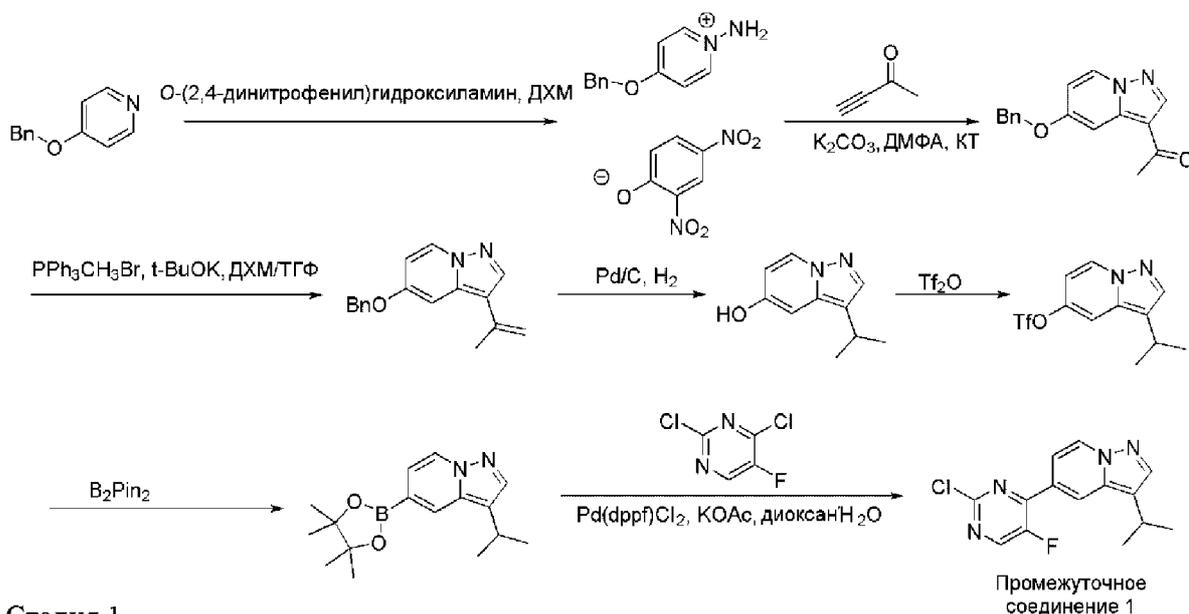
Растворитель В: 0,1% FA в ацетонитриле.

От 5% ACN до 95% ACN за 1,0 мин, удерживание 1,0 мин,

Всего 2,5 мин; Скорость потока: 1,8 мл/мин; Температура колонки 40 градусов.

#### Промежуточное соединение

##### Промежуточное соединение 1



##### Стадия 1

К раствору 4-бензилоксипиридина (185 мг, 998 мкмоль) в ДХМ (10 мл) добавляли амино-2,4,6-триметилбензолсульфонат (236 мг, 1,1 ммоль) при 25 °С. Реакционную смесь перемешивали при 25°С в течение 14 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного целевого продукта (400 мг) в виде бесцветного масла. ЖХ-МС:  $m/z$  202  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

##### Стадия 2

К раствору вышеуказанного продукта (187 мг, 487 мкмоль) в ДМФА (10 мл) добавляли  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (192 мг, 1,4 ммоль) и бут-3-ин-2-он (94 мг, 1,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 12 часов. Реакционную смесь гасили водой (50 мл) и экстрагировали ДХМ (2×25 мл). Органический слой промывали солевым раствором (20 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали при пониженном давлении. Осадок очищали при помощи колоночной хроматографии (элюирование ПЭ/ЭА=10/1) с получением целевого продукта (90 мг, выход 35%) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС:  $m/z$  267  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Стадия 3

К раствору бромид метил(трифенил)фосфония (241 мг, 675 мкмоль) в ТГФ (10 мл) по каплям добавляли бутиллитий (43,3 мг, 675 мкмоль) в атмосфере  $\text{N}_2$  при -20 °С. Реакционную смесь перемешивали при -20 °С в течение 1 ч. Затем по каплям добавляли раствор 1-(5-бензилоксипиразоло[1,5-а]пиридин-3-ил)этанона (90 мг, 338 мкмоль) в ТГФ (15 мл) при -20 °С. Реакционную смесь перемешивали при 10 °С в течение 3 часов. Реакционную смесь гасили  $\text{MeOH}$  (3 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Осадок очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (элюирование ПЭ:ЭА=1/1) с получением неочищенного целевого продукта (41 мг) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС:  $m/z$  265  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Стадия 4

К раствору 5-бензилокси-3-изопропенилпиразоло[1,5-а]пиридина (600 мг, 2,3 ммоль) в метаноле (50 мл) добавляли  $\text{Pd/C}$  (60 мг). Реакционную смесь перемешивали при 30 °С в атмосфере  $\text{H}_2$  в течение 48 часов. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением целевого продукта (380 мг) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС:  $m/z$  177  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Стадия 5

К раствору 3-изопропилпиразоло[1,5-а]пиридин-5-ола (650 мг, 3,7 ммоль) и DIPEA (410 мг, 4,1 ммоль) в ДХМ (15 мл) добавляли  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,1 г, 4,1 ммоль) в атмосфере  $\text{N}_2$  при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 часов. Реакционную смесь промывали солевым раствором (15 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Органический слой фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением целевого продукта (1,1 г) в виде бесцветного масла. ЖХ-МС:  $m/z$  309  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

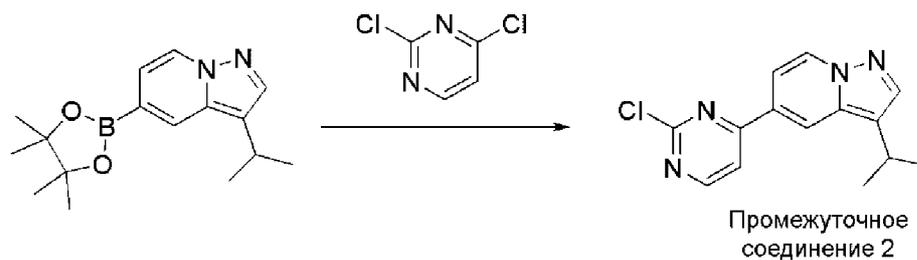
#### Стадия 6

К раствору (3-изопропилпиразоло[1,5-а]пиридин-5-ил)трифторметансульфоната (1,1 г, 3,4 ммоль) и 4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3,2-диоксаборолана (1,3 г, 5,1 ммоль) в диоксане (10 мл) добавляли  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (249 мг, 340 мкмоль) и КОАс (1,0 г, 10,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 110 °С в течение 2 часов в атмосфере  $\text{N}_2$ . Смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного целевого продукта (950 мг) в виде темного твердого вещества. ЖХ-МС:  $m/z$  287  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Стадия 7

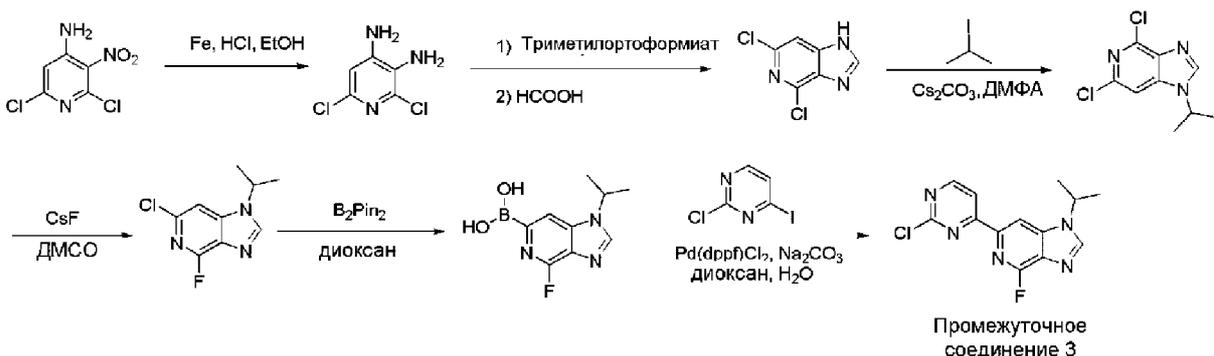
К раствору 3-изопропил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиридина (950 мг, 3,3 ммоль) и 2,4-дихлор-5-фторпиридина (665 мг, 4,0 ммоль) в H<sub>2</sub>O (1 мл) и 1,4-диоксане (15 мл) добавляли Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,2 г, 10 ммоль) и Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (242 мг, 332 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере N<sub>2</sub> при 110°C в течение 6 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении, и осадок очищали при помощи колоночной флэш-хроматографии (ПЭ/ЭА с ЭА 0-50%) с получением целевого продукта (650 мг, выход 67%) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС: m/z 291 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Промежуточное соединение 2



К раствору 3-изопропил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиридина (3,5 г, 12,2 ммоль) и 2,4-дихлорпиридина (2,7 г, 18,4 ммоль) в воде (3 мл) и 1,4-диоксане (60 мл) добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,9 г, 1,2 ммоль) и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,52 г, 14 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере N<sub>2</sub> при 110°C в течение 6 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении, и осадок очищали при помощи колоночной флэш-хроматографии (ПЭ/ЭА с ЭА 0-50%) с получением целевого продукта (2,1 г, выход 62%) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС: m/z 273 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Промежуточное соединение 3



#### Стадия 1

К смеси 2,6-дихлор-3-нитропиридин-4-амина (1500 г, 7,2 моль) и порошка железа (1933 г, 34,6 ммоль) в этиловом спирте (45 л) и воде (3 л) добавляли HCl (1,5 л, 12 М в H<sub>2</sub>O) в воде (6,5 л) по каплям при 0°C в течение 1 часа, полученную смесь перемешивали при 95°C в течение 16 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры и затем нейтрализовали гидрокарбонатом натрия (твердый) до pH=9. Смесь фильтровали и

промывали этилацетатом (500 мл). Фильтрат концентрировали для удаления растворителя. Затем раствор экстрагировали этилацетатом (9 л). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (1 л), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали с получением 2,6-дихлорпиридин-3,4-диамина (1200 г) в виде твердого желтого вещества.

#### Стадия 2

Раствор 2,6-дихлорпиридин-3,4-диамина (1200 г, 6,74 моль) в триэтоксиметане (3 л) перемешивали в атмосфере азота при 140°C в течение 28 часов. Смесь концентрировали. Добавляли муравьиную кислоту (1,5 л). Полученную смесь перемешивали при 120°C в течение 2 часов. Раствор концентрировали с получением остатка, который растирали с петролейным эфиром/этилацетатом (1/1, 400 мл) с получением 4,6-дихлор-1Н-имидазо[4,5-с]пиридина (1360 г) в виде желтого твердого вещества.

#### Стадия 3

Смесь 4,6-дихлор-1Н-имидазо[4,5-с]пиридина (1360 г, 5,8 моль),  $K_2CO_3$  (5680 г, 17,4 моль) и 2-йодпропана (3951 г, 23,2 моль) в ДМФА (5 л) перемешивали в атмосфере азота при 20 °C в течение 24 часов. К реакционной смеси добавляли этилацетат (40 л), и смесь фильтровали. Фильтрат концентрировали с получением остатка, который очищали на колонке с силикагелем (петролейный эфир/этилацетат от 3:1 до 1:1) с получением целевого продукта (710 г) в виде твердого желтого вещества.

#### Стадия 4

К смеси 4,6-дихлор-1-изопропилимидазо[4,5-с]пиридина (250 мг, 1,1 ммоль) в ДМСО (10 мл) добавляли CsF (510 мг, 3,4 ммоль), затем смесь перемешивали при 140°C в течение 1,5 часов. Полученную смесь выливали в воду (100 мл) и экстрагировали EA (3×30 мл). Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$  и фильтровали. Фильтрат концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-колонки (80 г силикагеля 200-300 меш, ПЭ/ЭА= 5/1-2/1) с получением целевого продукта (210 мг, 75% выход) в виде твердого вещества кремово-белого цвета. ЖХ-МС:  $m/z$  214,1  $[M+H]^+$ .

#### Стадия 5

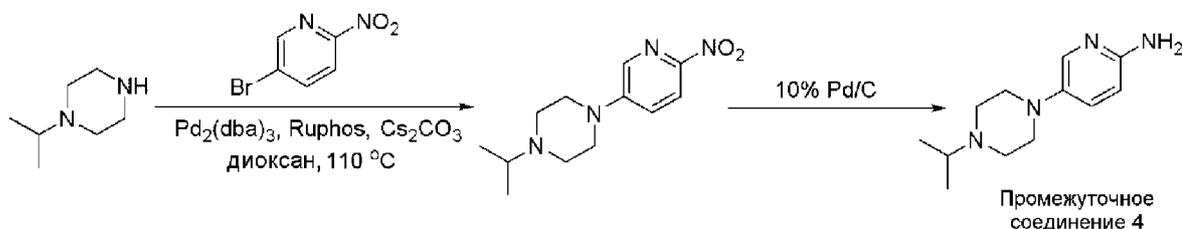
К раствору 6-хлор-4-фтор-1-изопропилимидазо[4,5-с]пиридина (30 мг, 140 мкмоль) и 4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3,2-диоксаборолана (35,6 мг, 140 мкмоль) в диоксане (5 мл) добавляли ацетат калия (41,3 мг, 421 мкмоль) и циклопентил(дифенил)фосфандихлорпалладиевое железо (15,4 мг, 21,1 мкмоль). Смесь дегазировали  $N_2$  и перемешивали при 110°C в течение 16 часов. Смесь фильтровали через слой целита. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного целевого продукта (50 мг) в виде черного масла, которое использовали напрямую на следующей стадии. ЖХ-МС:  $m/z$  224,2  $[M+H]^+$ .

#### Стадия 6

К раствору (4-фтор-1-изопропилимидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)бороновой кислоты (50 мг, 224 мкмоль) и 2-хлор-4-йодпиримидина (53,9 мг, 224 мкмоль) в диоксане (3 мл)

добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (24,6 мг, 33,6 мкмоль) и KOAc (66 мг, 672 мкмоль). Смесь дегазировали N<sub>2</sub> и перемешивали при 110°C в течение 16 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Осадок очищали при помощи флэш-хроматографии, элюируя этилацетатом в петролейном эфире 0-60%, с получением целевого продукта (30 мг, выход 46%) в виде твердого белого вещества. ЖХ-МС: m/z 292,1 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Промежуточное соединение 4



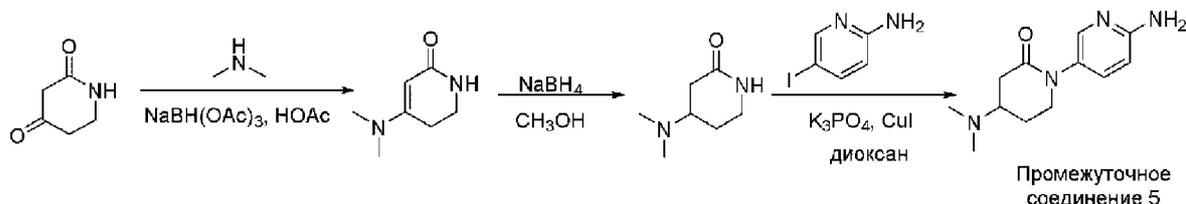
#### Стадия 1

К раствору 5-бром-2-нитропиридина (1 г, 4,9 ммоль) и 1-изопропилпиперазина (631,6 мг, 4,9 ммоль) в диоксане (40 мл) добавляли трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (451,1 мг, 492 мкмоль), (5-дифенилфосфанил-9,9-диметилксантен-4-ил)дифенилфосфан (570 мг, 985 мкмоль) и карбонат цезия (4,8 г, 14,8 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при 110°C в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 3 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и очищали при помощи хроматографии на силикагеле, элюируя этилацетатом в петролейном эфире 1-100%, с получением целевого продукта (850 мг, выход 68%) в виде твердого желтого вещества. ЖХ-МС: m/z 251,1 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Стадия 2

К раствору 1-изопропил-4-(6-нитро-3-пиридил)пиперазина (850 мг, 3,4 ммоль) в метаноле (30 мл) добавляли Pd/C (412 мг, 10%). Затем реакционную смесь трижды дегазировали H<sub>2</sub> и перемешивали при 25°C в течение 3 ч. Реакционную смесь фильтровали, а затем промывали метанолом (20 мл). Объединенный растворитель концентрировали при пониженном давлении с получением целевого продукта (620 мг, выход 82%) в виде твердого коричневого вещества. ЖХ-МС: m/z 221,2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Промежуточное соединение 5



#### Стадия 1

К смеси пиперидин-2,4-диона (2,1 г, 18,5 ммоль) и N-метилметанамина (3,4 г, 74,2 ммоль) в ДХМ (36 мл) и ТГФ (18 мл) добавляли CH<sub>3</sub>COOH (10 мл), полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 25°C в течение 3 часов. К указанной смеси

добавляли триацетоксиборгидрид натрия (7,8 г, 37,1 ммоль), полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 25°C в течение 12 часов. Реакционную смесь гасили водой (50 мл) и концентрировали под вакуумом для удаления ДХМ и ТГФ. Смесь экстрагировали ДХМ (3×100 мл). Органический раствор промывали соевым раствором (20 мл). Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением целевого продукта (2,6 г), который использовали на следующей стадии без какой-либо очистки. ЖХ-МС: m/z 141,2 [M+H]<sup>+</sup>.

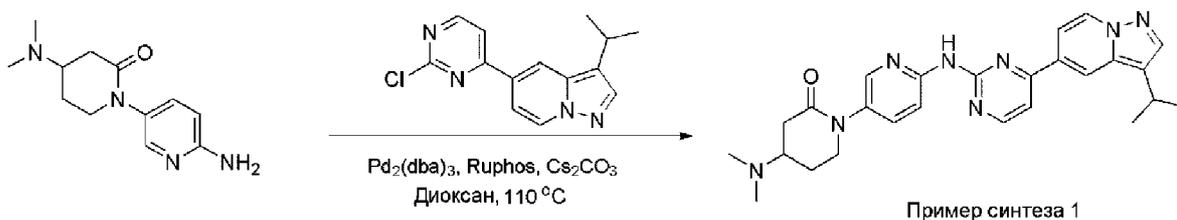
#### Стадия 2

К смеси 4-(диметиламино)-2,3-дигидро-1H-пиридин-6-она (1,0 г, 7,1 ммоль) в метаноле (15 мл) добавляли боргидрид натрия (539 мг, 14,2 ммоль), полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 25°C в течение 12 часов. Реакционную смесь гасили насыщ. водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (10 мл), а затем концентрировали под вакуумом для удаления MeOH. Водный раствор очищали при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии (C18, 40 г), элюируя (MeCN/вода (0,1% NH<sub>4</sub>OH)=1/10), с получением целевого продукта (0,3 г, выход 32%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХ-МС: m/z 143,2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Стадия 3

К смеси 4-(диметиламино)пиперидин-2-она (270 мг, 1,9 ммоль), 5-йодпиридин-2-амин (1,0 г, 4,7 ммоль) и фосфата калия (1,2 г, 5,7 ммоль) в диоксане (26 мл) добавляли (1S,2S)-N1,N2-диметилциклогексан-1,2-диамин (162 мг, 1,1 ммоль) и CuI (108 мг, 569 мкмоль), полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 110°C в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали. Фильтрат концентрировали под вакуумом с получением осадка, который очищали при помощи обращенно-фазовой колонки (C18, 20 г), элюируя (MeCN/вода (0,1% NH<sub>4</sub>OH)=1/10), с получением целевого продукта (272 мг, выход 61%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХ-МС: m/z 235,2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Пример синтеза 1



К смеси 1-(6-амино-3-пиридил)-4-(диметиламино)пиперидин-2-она (30 мг, 128 мкмоль) и 5-(2-хлорпиримидин-4-ил)-3-изопропилпиразоло[1,5-а]пиридина (38,4 мг, 140,8 мкмоль) в диоксане (5 мл) добавляли карбонат цезия (125,1 мг, 384,1 мкмоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (11,7 мг, 12,8 мкмоль) и RuPhos (11,9 мг, 25,6 мкмоль). Полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 110°C в течение 4 часов. Фильтровали реакционную смесь и экстрагировали смесь ЭА (20 мл). Органическую фазу промывали водой (3×20 мл), соевый раствор (3×20 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Смесь концентрировали при пониженном давлении и очищали при помощи



мкМ FL-34 (5-FAM-RRRFRPASPLRGPPK) и тестируемое соединение в соответствующих разведениях в ДМСО. Все компоненты добавляли в 384-луночный планшет (Corning, 4514) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл стоп-буфера (180 мМ HEPES (pH 7,5), 20 мМ EDTA, реагент Coating-3 (PerkinElmer, 760050)). Затем планшет загружали в ридер Caliper EZ (EZ Reader II, PerkinElmer, HD-4HYSG2772), и реакционные смеси, включая субстрат и продукт, переносили в микрожидкостной чип для разделения и обнаружения. Значения  $IC_{50}$  тестируемого соединения определяли путем подгонки кривых ингибирования с помощью 4-параметрической сигмоидальной модели доза-ответ с использованием программного обеспечения Xlfit5/GraphPad Prism 5.

### ***Биологический пример 2. Анализ на ингибирование CDK6/CyclinD3***

Ферментный анализ CDK6 для определения  $IC_{50}$  выполняли следующим образом. Технологию обнаружения микрофлюидных киназ (Caliper) использовали для мониторинга фосфорилирования пептидного субстрата с помощью CDK6/CyclinD3. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл, содержащий буфер А (100 мМ HEPES (pH 7,5), 0,1% BSA, 0,01% Triton X-100, 1 мМ DTT, 10 мМ  $MgCl_2$ , 10 мкМ ортованадата натрия, 10 мкМ бета-глицерофосфата), 300 мкМ АТФ, 2 нМ CDK6/CyclinD1 (Carna, 04-107), 1 мкМ FL-34 (5-FAM-RRRFRPASPLRGPPK) и тестируемое соединение в соответствующих разведениях в ДМСО. Все компоненты добавляли в 384-луночный планшет (Corning, 4514) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл стоп-буфера (180 мМ HEPES (pH 7,5), 20 мМ EDTA, реагент Coating-3 (PerkinElmer, 760050)). Затем планшет загружали в ридер Caliper EZ (EZ Reader II, PerkinElmer, HD-4HYSG2772), и реакционные смеси, включая субстрат и продукт, переносили в микрожидкостной чип для разделения и обнаружения. Значения  $IC_{50}$  тестируемого соединения определяли путем подгонки кривых ингибирования с помощью 4-параметрической сигмоидальной модели доза-ответ с использованием программного обеспечения Xlfit5/GraphPad Prism 5.

### ***Биологический пример 3. Анализ на ингибирование CDK2/CyclinE1***

Ферментный анализ CDK2 для определения  $IC_{50}$  выполняли следующим образом. Технологию обнаружения микрофлюидных киназ (Caliper) использовали для мониторинга фосфорилирования пептидного субстрата с помощью CDK2/CyclinE1. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл, содержащий буфер А (100 мМ HEPES (pH 7,5), 0,1% BSA, 0,01% Triton X-100, 1 мМ DTT, 10 мМ  $MgCl_2$ , 10 мкМ ортованадата натрия, 10 мкМ бета-глицерофосфата), 100 мкМ АТФ, 5 нМ CDK2/CyclinE1 (SignalChem, C29-18G), 5 мкМ FL-18 (5-FAM-QSPKKG-NH<sub>2</sub>) и тестируемое соединение в соответствующих разведениях в ДМСО. Все компоненты добавляли в 384-луночный планшет (Corning, 4514) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл стоп-буфера (180 мМ HEPES (pH 7,5), 20 мМ EDTA, реагент Coating-3 (PerkinElmer, 760050)). Планшет загружали в ридер Caliper EZ (EZ Reader II, PerkinElmer, HD-4HYSG2772), и реакционные смеси, включая субстрат и

продукт, переносили в микрожидкостной чип для разделения и обнаружения. Значения  $IC_{50}$  тестируемого соединения определяли путем подгонки кривых ингибирования с помощью 4-параметрической сигмоидальной модели доза-ответ с использованием программного обеспечения Xlfit5/GraphPad Prism 5.

Значения  $IC_{50}$  каждого приведенного в качестве примера соединения против CDK2, CDK4 и CDK6 представлены в примерах синтеза ниже. Значения  $IC_{50}$  обозначены как «А», «В», «С» и «D» для значений, меньших или равных 10 нМ; меньших или равных 100 нМ; меньших или равных 1 мкМ; и больших, чем 1 мкМ, соответственно.

#### ***Биологический пример 4. Анализ антипролиферации в клетке T47D***

T47D представляет собой линию клеток рака молочной железы человека, обычно используемую в биомедицинских исследованиях, включающих гормональную экспрессию раковых клеток. Клетки T47D отличаются от других клеток рака молочной железы человека тем, что их прогестероновые рецепторы (PR) не регулируются эстрадиолом, гормоном, который обильно присутствует в самих клетках. Клетки T47D использовались в исследованиях влияния прогестерона на рак молочной железы и соответствующей регуляции транскрипции, вызванной введенными лекарствами. Было отмечено, что указанные клетки чрезвычайно устойчивы к эстрогенам и антиэстрогенам.

Клетки рака молочной железы T47D из Американской коллекции типовых культур (ATCC, HTB-133) высевали из расчета 3000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты и инкубировали в среде RPMI 1640 (Gibco, 31800105) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Biowest, FB-1058) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации в течение ночи измеряли исходные значения образцов с одного планшета с использованием реагента Cyquant (Invitrogen, C35011) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки инкубировали с детектирующим реагентом в течение 1 часа при 37 °C, а затем измеряли флуоресценцию при возбуждении при 485 нм и эмиссии при 535 нм с использованием Spectra Max M5 (Molecular Devices, HD-4HYSG3196). В другие планшеты добавляли соединения при концентрации в концентрации дозы в десять точек от 10 мкМ до 0,51 нМ в 3-кратной схеме разведения. На 6 день после добавления соединения добавляли реагент Cyquant и измеряли флуоресценцию с помощью Spectra Max M5. Значения  $IC_{50}$  антипролиферативной активности тестируемого соединения определяли по кривой вычитания показателей жизнеспособности на исходном уровне с использованием программного обеспечения Xlfit5/GraphPad Prism 5.

#### ***Биологический пример 5. Ингибирование фосфорилирования белка ретинобластомы (pRb) в клетке T47D***

Клетки рака молочной железы T47D из Американской коллекции типовых культур (ATCC, HTB-133) высевали из расчета 40000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и инкубировали в среде RPMI 1640 (Gibco, 31800105) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Biowest, FB-1058). Затем клетки оставляли для сцепления на ночь при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день соединения титровали по схеме 3-кратного разбавления, и самая высокая тестируемая концентрация соединения составляла 10 мкМ. После 24 часов

инкубации с соединениями клетки лизировали в ледяном буфере для лизиса, содержащем смесь ингибиторов фосфатазы и 1 мМ PMSF. Лизаты клеток (50 мкл/лунку) затем переносили в планшеты для ELISA (набор для ELISA pRb Ser807/811, Cell Signaling, 13152 или набор для ELISA pRb Ser780, Cell Signaling, 13016)). Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном медленном встряхивании. После инкубации планшеты промывали в соответствии с рекомендациями производителя, а затем в каждую лунку добавляли 100 мкл восстановленного детектирующего антитела и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После инкубации планшеты промывали, а затем в каждую лунку добавляли 100 мкл восстановленного вторичного антитела, связанного с HRP, и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. После инкубации планшеты промывали. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 мин при 37°C или 30 мин при 25 °С. Наконец, в каждую лунку добавляли 100 мкл STOP-раствора и осторожно перемешивали в течение нескольких секунд. Планшеты считывали на планшет-ридере Envision (PerkinElmer, 2104-0010) с использованием 96-луночного режима люминесценции. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием 4-параметрической сигмоидальной модели зависимости реакции от дозы программного обеспечения Xlfit5/GraphPad Prism 5.

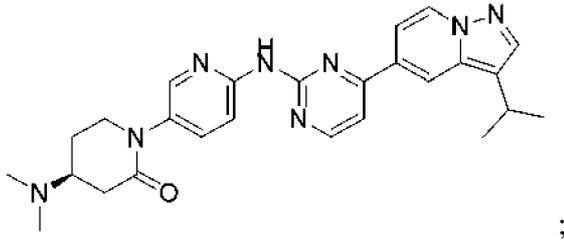
Клеточные данные, полученные из биологических примеров 4 и 5, перечислены в Таблице А ниже. Значения IC<sub>50</sub> обозначены как «++++» для значений, меньших или равных 100 нМ; «+++» для значений меньше или равных 500 нМ; «++» для значений меньше или равных 1 мкМ; и «+» для значений более 1 мкМ соответственно.

Таблица А

Пример синтеза	CDK4 IC <sub>50</sub>	CDK6 IC <sub>50</sub>	CDK2 IC <sub>50</sub>	T47D IC <sub>50</sub>	Фосфо T47D Ser807 IC <sub>50</sub>
1	A	A	B	++++	++++
2	A	B	B	++++	++++
3	A	A	A	++++	++++
4	A	B	C	++++	++++

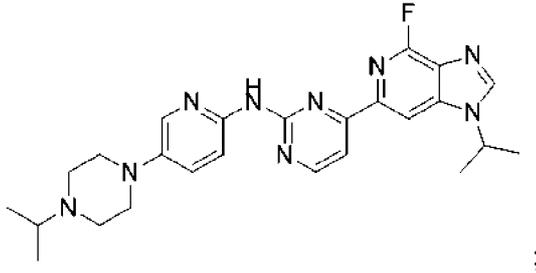
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение, представленное следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по п. 1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель.

4. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п. 1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 3, при этом рак представляет собой карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, эпидермиса, печени, легкого, пищевода, желчного пузыря, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, носа, головы и шеи, предстательной железы или кожи; гематопозитическую опухоль лимфоидной линии; гематопозитическую опухоль миелоидной линии; фолликулярный рак щитовидной железы; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; меланому; семеному; тератокарциному; остеосаркому; пигментную ксеродерму; кератоакантому; фолликулярный рак щитовидной железы; или саркому Капоши.

5. Способ ингибирования активности циклинзависимой киназы (CDK) у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения по п. 1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 3.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что субъект имеет рак, такой как карцинома мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, эпидермиса, печени, легкого, пищевода, желчного пузыря, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, носа, головы и шеи, предстательной железы или кожи; гематопозитическая опухоль лимфоидной линии; гематопозитическая опухоль миелоидной

линии; фолликулярный рак щитовидной железы; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; меланома; семенома; тератокарцинома; остеосаркома; пигментная ксеродерма; кератоакантома; фолликулярный рак щитовидной железы; или саркома Капоши.

7. Способ по п. 5 или 6, отличающийся тем, что гематопозитическая опухоль лимфоидной линии представляет собой лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфолейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, множественную миелому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, волосатоклеточную лимфому или лимфому Беркетта.

8. Способ по п. 5 или 6, отличающийся тем, что рак представляет собой pRb<sup>+</sup> рак молочной железы или гормон-рецептор(HR)-положительный (например, положительный по рецептору эстрогена (ER<sup>+</sup>), положительный по рецептору прогестерона (PR<sup>+</sup>) или ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>), HER2/neu-отрицательный рак.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что рак представляет собой распространенный, метастатический или рецидивирующий рак молочной железы.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что рак молочной железы встречается у взрослой женщины или женщины в постменопаузе.

11. Способ по любому из пп. 8-10, дополнительно включающий введение второго агента, выбранного из: ингибитора ароматазы, селективного модулятора рецептора эстрогена (SERM), чистого антиэстрогена, не обладающего активностью агониста эстрагена, соединения, которое временно подавляет функцию яичников (например, выработку эстрогена и/или прогестерона), такого как агонист гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH) или агонист рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LH-RH), соединения, которое ингибирует CCYP3A4, или моноклонального антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента против IGF-1/IGF-2.

12. Способ по любому из пп. 4-11, дополнительно включающий введение ингибитора иммунной контрольной точки (такого как ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1 или ингибитор CTLA-4), ингибитора рецепторной Туг-киназы и/или антагониста рецептора гормона (например, рецептора эстрогена).

По доверенности