

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391087 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.28(22) Дата подачи заявки
2021.10.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/496* (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА PARP1

(31) 63/089,859

(32) 2020.10.09

(33) US

(86) PCT/IB2021/059232

(87) WO 2022/074617 2022.04.14

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА ЮКЕЙ ЛИМИТЕД
(GB); ДАЙТИ САНКИО
КОМПАНИ, ЛИМИТЕД (JP)

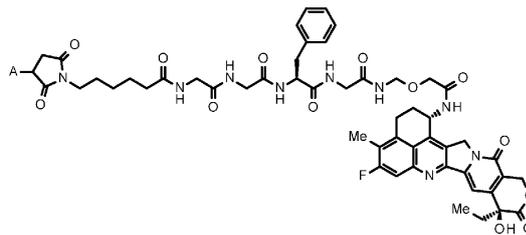
(72) Изобретатель:

Меттетел П Джером Томас (US),
Астанех Азадех Черагчи Баши, Лео
Элизабетта, Уоллес Янн (GB)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлен фармацевтический продукт для введения конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства в комбинации с селективным ингибитором PARP1. Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственного средство-линкер, представленный следующей формулой (где А представляет собой положение присоединения к антителу), конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи. Также представлены терапевтическое применение и способ, где конъюгат антитела и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации субъекту, формула (I).



A1

202391087

202391087

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577785EA/032

КОМБИНАЦИЯ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА PARP1

[Область техники, к которой относится изобретение]

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому продукту для введения конкретного конъюгата антитела и лекарственного средства, содержащего противоопухолевое лекарственное средство, конъюгированное с антителом к HER2 посредством линкерной структуры, в комбинации с селективным ингибитором PARP1, и к терапевтическому применению и способу, где конкретные конъюгат антитела и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации субъекту.

[Уровень техники]

Семейство ферментов поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) играет важную роль в ряде клеточных процессов, таких как репликация, рекомбинация, ремоделирование хроматина и репарация повреждений ДНК (O'Connor MJ, Mol Cell (2015) 60(4) :547-60). Примеры ингибиторов PARP и механизм их действия изложены, например, в WO 2004/080976.

PARP1 и PARP2 представляют собой наиболее широко изученные PARP с точки зрения их роли в репарации повреждений ДНК. PARP1 активируется разрывами, представляющими собой повреждения ДНК, и осуществляет катализ добавления цепей поли(АДФ-рибоза) (PAR) к целевым белкам. Данная посттрансляционная модификация, известная как парилирование, опосредует рекрутирование дополнительных факторов репарации ДНК в очаги повреждения ДНК. После завершения выполнения данной роли, представляющей собой рекрутирование, аутопарилирование PARP запускает высвобождение связанной PARP из ДНК с обеспечением доступа для других белков репарации ДНК для завершения репарации. Таким образом, все стадии из связывания PARP с поврежденными сайтами, индукции ее каталитической активности и ее последующего высвобождения из ДНК представляют собой важные стадии ответа раковой клетки на повреждение ДНК, обусловленное химиотерапевтическими средствами и лучевой терапией (Bai P. Biology of poly(ADP-ribose) polymerases: the factotums of cell maintenance. Mol Cell 2015;58:947-58).

Ингибирование ферментов семейства PARP используют в качестве стратегии селективного уничтожения раковых клеток посредством инактивации дополнительных путей репарации ДНК. В ходе ряда доклинических и клинических исследований было продемонстрировано, что опухолевые клетки, несущие вредоносные изменения BRCA1 или BRCA2, основных белков-супрессоров опухоли, участвующих в репарации двухнитевого разрыва ДНК (DSB) посредством гомологичной рекомбинации (HR), являются селективно чувствительными в отношении низкомолекулярных ингибиторов семейства ферментов репарации ДНК PARP. Такие опухоли являются дефектными в

отношении путей репарации посредством гомологичной рекомбинации (HRR), и их выживание зависит от функционирования ферментов PARP. Несмотря на то, что терапия с применением ингибитора PARP была преимущественно нацелена на виды рака с мутацией BRCA, ингибиторы PARP подвергали клиническим тестам в отношении опухолей без мутации BRCA, которые демонстрировали дефектность в отношении гомологичной рекомбинации (HRD) (Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004;4: 814-9).

Полагают, что ингибиторы PARP с улучшенной селективностью в отношении PARP1, могут обладать улучшенной эффективностью и сниженной токсичностью по сравнению с неселективными ингибиторами PARP. Также полагают, что селективное выраженное ингибирование PARP1 будет приводить к захвату PARP1 на ДНК, приводящему к двухнитевым разрывам ДНК (DSB) посредством коллапса вилки репликации в S-фазе. Также полагают, что блокирование PARP1 на ДНК представляет собой эффективный механизм селективного уничтожения опухолевых клеток с HRD.

Конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), которые состоят из цитотоксического лекарственного средства, конъюгированного с антителом, могут обеспечивать доставку лекарственного средства селективно в раковые клетки, и, следовательно, ожидается, что это обуславливает накопление лекарственного средства внутри раковых клеток и уничтожение раковых клеток (Ducry, L., et al., *Bioconjugate Chem.* (2010) 21, 5-13; Alley, S. C., et al., *Current Opinion in Chemical Biology* (2010) 14, 529-537; Damle N. K. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, 1445-1452; Senter P. D., et al., *Nature Biotechnology* (2012) 30, 631-637; Burris HA., et al., *J. Clin. Oncol.* (2011) 29(4): 398-405).

Одним таким конъюгатом антитела и лекарственного средства является трастузумаб дерукстекан, который состоит из нацеливающегося на HER2 антитела и производного эксатекана (Ogitani Y. et al., *Clinical Cancer Research* (2016) 22(20), 5097-5108; Ogitani Y. et al., *Cancer Science* (2016) 107, 1039-1046).

Трастузумаб дерукстекан (Enhertu[®], DS-8201) проявляет значительную клиническую эффективность при солидных опухолях, экспрессирующих HER2, в том числе раке молочной железы, раке желудка, колоректальном раке и немелкоклеточном раке легкого. Следует отметить, что DS-8201 проявляет многообещающую активность в отношении опухолей с низким уровнем HER2 по вышеуказанным показаниям. Существует необходимость в идентификации партнеров по комбинации для DS-8201 для повышения эффективности, увеличения продолжительности терапевтического ответа, улучшения переносимости пациентами и/или снижения дозозависимой токсичности.

Несмотря на терапевтический потенциал конъюгатов антитела и лекарственного средства, таких как трастузумаб дерукстекан, и ингибиторов PARP1, нет опубликованной литературы, в которой описаны результаты тестов, из которых виден превосходный эффект комбинированного применения конъюгата антитела и

лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1.

Соответственно, остается потребность в улучшенных терапевтических композициях и способах, которые могут усилить эффективность существующих средств для лечения рака, повысить продолжительность терапевтического ответа, улучшить переносимость пациентами и/или снизить дозозависимую токсичность.

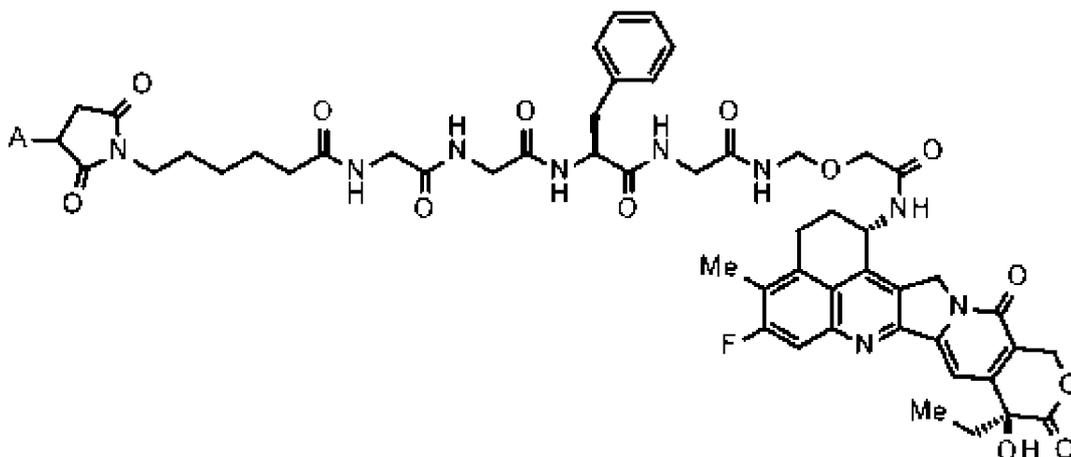
[Сущность изобретения]

Было подтверждено, что конъюгат антитела и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении (конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который включает производное ингибитора топоизомеразы I, эксатекан, в качестве компонента) проявляет отличный противоопухолевый эффект при лечении некоторых видов рака, таких как рак молочной железы и рак желудка, при введении отдельно. Кроме того, было подтверждено, что ингибитор PARP1 проявляет противоопухолевый эффект при лечении некоторых видов рака. Однако, необходимо обеспечивать лекарственный препарат и лечение, с помощью которых можно получить превосходный противоопухолевый эффект при лечении видов рака, такой как усиленная эффективность, повышенная продолжительность терапевтического ответа и/или сниженная дозозависимая токсичность.

В настоящем изобретении предусмотрен фармацевтический продукт, который может проявлять отличный противоопухолевый эффект при лечении видов рака посредством введения конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства в комбинации с селективным ингибитором PARP1. В настоящем изобретении также предусмотрены терапевтическое применение и способ, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации субъекту.

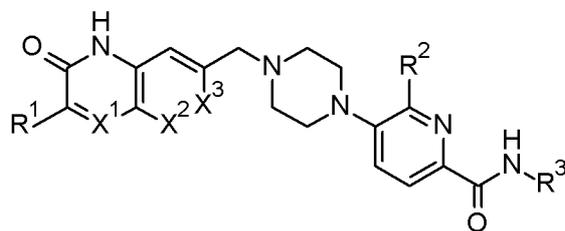
Конкретно, настоящее изобретение относится к следующим пунктам [1]-[54].

[1] Фармацевтический продукт, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для введения в комбинации, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственного средства-линкер, представленный следующей формулой:



где А представляет собой положение присоединения к антителу, конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи;

[2] Фармацевтический продукт в соответствии с [1], где селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой (I),



(I),

где

каждый из X^1 и X^2 независимо выбран из N и C(H),

X^3 независимо выбран из N и C(R^4), где R^4 представляет собой H или фтор,

R^1 представляет собой C_{1-4} алкил или C_{1-4} фторалкил,

R^2 независимо выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила, и

R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль,

при условии, что

если X^1 представляет собой N, то X^2 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4),

если X^2 представляет собой N, то X^1 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4), и

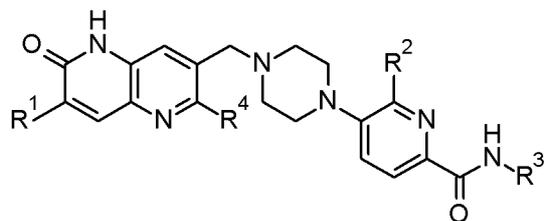
если X^3 представляет собой N, то X^1 и X^2 одновременно представляют собой C(H).

[3] Фармацевтический продукт в соответствии с [2], где в формуле (I) R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

[4] Фармацевтический продукт в соответствии с [3], где в формуле (I) R^3 представляет собой метил.

[5] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [2]-[4], где в формуле (I) R^1 представляет собой этил.

[6] Фармацевтический продукт в соответствии с [1], где селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой (Ia),



(Ia),

где

R^1 представляет собой C_{1-4} алкил,

R^2 выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила,

R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил, и

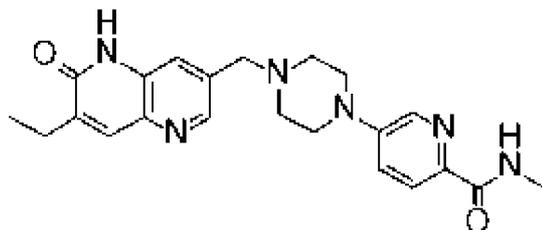
R^4 представляет собой H,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[7] Фармацевтический продукт в соответствии с [6], где в формуле (Ia) R^2 представляет собой H или галоген.

[8] Фармацевтический продукт в соответствии с [6], где в формуле (Ia) R^1 представляет собой этил, R^2 выбран из H, хлора и фтора, и R^3 представляет собой метил.

[9] Фармацевтический продукт в соответствии с [1], где селективный ингибитор PARP1 представляет собой AZD5305, также известный как AZ14170049, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

[10] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[9], где антитело к HER2 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 3 [= аминокислотные остатки 26-33 из SEQ ID NO: 1], CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 [= аминокислотные остатки 51-58 из SEQ ID NO: 1], и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 5 [= аминокислотные остатки 97-109 из SEQ ID NO: 1], и легкую цепь, содержащую CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 6 [= аминокислотные остатки 27-32 из SEQ ID NO: 2], CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 1-3 из SEQ ID NO: 7 [= аминокислотные остатки 50-52 из SEQ ID NO: 2], и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 [= аминокислотные остатки 89-97 из SEQ ID NO: 2].

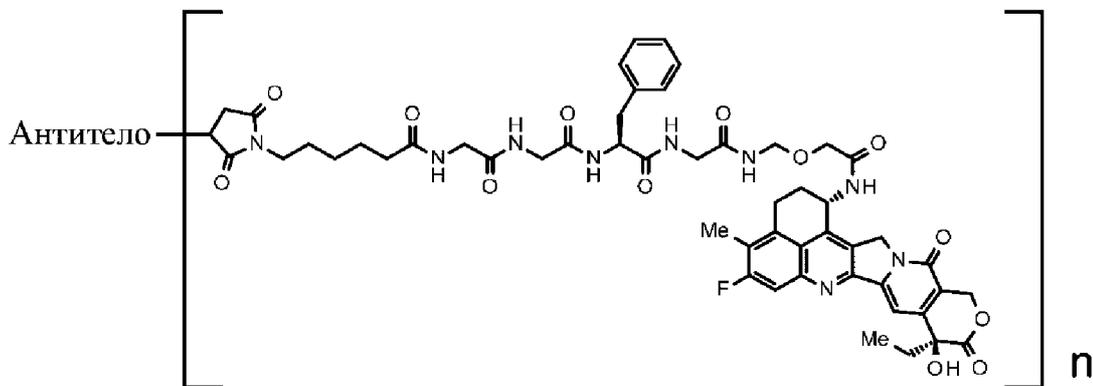
[11] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[9], где антитело к HER2 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую варируемую область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 [= аминокислотные остатки 1-120 из SEQ ID NO: 1], и легкую цепь, содержащую варируемую область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:

10 [= аминокислотные остатки 1-107 из SEQ ID NO: 2].

[12] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[9], где антитело к HER2 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

[13] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[9], где антитело к HER2 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 [= аминокислотные остатки 1-449 из SEQ ID NO: 1], и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

[14] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[13], где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представлен следующей формулой:



где 'антитело' обозначает антитело к HER2, конъюгированное с фрагментом лекарственного средство-линкер посредством тиозфирной связи, и n обозначает среднее количество звеньев фрагмента лекарственного средство-линкер, конъюгированных на молекулу антитела в конъюгате антитела и лекарственного средства, где n находится в диапазоне от 7 до 8.

[15] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[14], где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой трастузумаб дерукстекал (DS-8201).

[16] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[15], где продукт представляет собой композицию, содержащую конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для одновременного введения.

[17] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[15], где продукт представляет собой комбинированный препарат, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для последовательного или одновременного введения.

[18] Фармацевтический продукт в соответствии с любым из [1]-[17], где продукт предназначен для лечения рака.

[19] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого, рака пищевода, рака головы и шеи, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока, болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, стромальной опухоли пищеварительного тракта, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы.

[20] Фармацевтический продукт в соответствии с [19], где рак представляет собой рак молочной железы.

[21] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 3+.

[22] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с низкой экспрессией HER2.

[23] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 2+.

[24] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 1+.

[25] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, который больше 0 и меньше 1+.

[26] Фармацевтический продукт в соответствии с [20], где рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

[27] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак желудка.

[28] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой колоректальный рак.

[29] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак легкого.

[30] Фармацевтический продукт в соответствии с [29], где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

[31] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

[32] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак яичника.

[33] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак предстательной железы.

[34] Фармацевтический продукт в соответствии с [18], где рак представляет собой рак почки.

[35] Фармацевтический продукт, определенный в любом из [1]-[17], для применения в лечении рака.

[36] Фармацевтический продукт для применения в соответствии с [25], где рак определен в любом из [19]-[34].

[37] Применение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства или селективного ингибитора PARP1 в изготовлении лекарственного препарата для введения конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 в комбинации, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 определены в любом из пп. 1-15, для лечения рака.

[38] Применение в соответствии с [37], где рак определен в любом из [19]-[34].

[39] Применение в соответствии с [37] или [38], где лекарственный препарат представляет собой композицию, содержащую конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для одновременного введения.

[40] Применение в соответствии с [37] или [38], где лекарственный препарат представляет собой комбинированный препарат, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для последовательного или одновременного введения.

[41] Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства для применения в комбинации с селективным ингибитором PARP1 в лечении рака, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 определены в любом из [1]-[15].

[42] Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства для применения в соответствии с [41], где рак определен в любом из [19]-[34].

[43] Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства для применения в соответствии с [41] или [42], где применение предусматривает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 последовательно.

[44] Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства для применения в соответствии с [41] или [42], где применение предусматривает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 одновременно.

[45] Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства для применения при лечении рака у субъекта, где указанное лечение предусматривает раздельное, последовательное или одновременное введение i) указанного конъюгата антитела к

HER2 и лекарственного средства и ii) селективного ингибитора PARP1 указанному субъекту, где указанный конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и указанный селективный ингибитор PARP1 определены в любом из [1]-[15].

[46] Селективный ингибитор PARP1 для применения в комбинации с конъюгатом антитела к HER2 и лекарственного средства при лечении рака, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 определены в любом из [1]-[15].

[47] Селективный ингибитор PARP1 для применения в соответствии с [46], где рак определен в любом из [19]-[34].

[48] Селективный ингибитор PARP1 для применения в соответствии с [46] или [47], где применение предусматривает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 последовательно.

[49] Селективный ингибитор PARP1 для применения в соответствии с [46] или [47], где применение предусматривает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 одновременно.

[50] Селективный ингибитор PARP1 для применения при лечении рака у субъекта, где указанное лечение предусматривает раздельное, последовательное или одновременное введение i) указанного селективного ингибитора PARP1 и ii) конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства указанному субъекту, где указанный селективный ингибитор PARP1 и указанный конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства определены в любом из [1]-[15].

[51] Способ лечения рака, включающий введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1, определенных в любом из [1]-[15], в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом.

[52] Способ в соответствии с [51], где рак определен в любом из [19]-[34].

[53] Способ в соответствии с [51] или [52], где способ включает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 последовательно. И

[54] способ в соответствии с [51] или [52], где способ включает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 одновременно.

[Преимущественные эффекты настоящего изобретения]

В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтический продукт, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, содержащий противоопухолевое лекарственное средство, конъюгированное с антителом к HER2 посредством линкерной структуры, и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации, и терапевтическое применение и способ, где конкретный конъюгат антитела и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации субъекту. Таким образом, настоящее изобретение может обеспечивать лекарственный препарат и лечение, с помощью которых можно получить превосходный противоопухолевый эффект при

лечении видов рака.

[Краткое описание графических материалов]

[Фигура 1] На фигуре 1 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к HER2 (SEQ ID NO: 1).

[Фигура 2] На фигуре 2 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к HER2 (SEQ ID NO: 2).

[Фигура 3] На фигуре 3 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность CDRH1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 3 [= аминокислотные остатки 26-33 из SEQ ID NO: 1]).

[Фигура 4] На фигуре 4 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность CDRH2 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4 [= аминокислотные остатки 51-58 из SEQ ID NO: 1]).

[Фигура 5] На фигуре 5 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность CDRH3 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5 [= аминокислотные остатки 97-109 из SEQ ID NO: 1]).

[Фигура 6] На фигуре 6 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность CDRL1 легкой цепи (SEQ ID NO: 6 [= аминокислотные остатки 27-32 из SEQ ID NO: 2]).

[Фигура 7] На фигуре 7 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность, содержащая аминокислотную последовательность CDRL2 легкой цепи (SAS) (SEQ ID NO: 7 [= аминокислотные остатки 50-56 из SEQ ID NO: 2]).

[Фигура 8] На фигуре 8 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность CDRL3 легкой цепи (SEQ ID NO: 8 [= аминокислотные остатки 89-97 из SEQ ID NO: 2]).

[Фигура 9] На фигуре 9 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 9 [= аминокислотные остатки 1-120 из SEQ ID NO: 1]).

[Фигура 10] На фигуре 10 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 10 [= аминокислотные остатки 1-107 из SEQ ID NO: 2]).

[Фигура 11] На фигуре 11 представлено графическое изображение, на котором показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 11 [= аминокислотные остатки 1-449 из SEQ ID NO: 1]).

[Фигуры 12A и 12B] На фигурах 12A и 12B представлены графические изображения, на которых показаны комбинационные матрицы, полученные с помощью высокопродуктивных скринингов, в которых производится комбинирование DS-8201 с AZD5305 (AZ14170049; селективный ингибитор PARP1), в клеточных линиях с высокой

экспрессией HER2.

[Фигуры 13А и 13В] На фигурах 13А и 13В представлены графические изображения, на которых показаны комбинационные матрицы, полученные с помощью высокопродуктивных скринингов, в которых производится комбинирование DS-8201 с AZD5305, в клеточных линиях с низкой экспрессией HER2.

[Фигура 14] На фигуре 14 представлено графическое изображение, на котором показаны значение E_{max} и баллы синергии согласно Loewe комбинации в клеточных линиях, обработанных DS-8201 в комбинации с AZD5305.

[Фигуры 15А и 15В] На фигурах 15А и 15В представлены графические изображения, на которых показаны комбинационные матрицы, в которых производится комбинирование DS-8201 с AZD5305, в клеточных линиях с низкой или высокой экспрессией HER2.

[Фигуры 16А и 16В] На фигурах 16А и 16В показаны соответственно дифракционная рентгенограмма и репрезентативная кривая DSC для формы А примера 4 синтеза.

[Фигура 17] На фигуре 17 представлен график, на котором показаны значения объема опухоли для циклов *in vivo* обработки с помощью отдельно DS-8201 или AZD5305 или с помощью DS-8201 в комбинации с AZD5305. Пунктирная линия представляет окончание периода введения доз AZD5305.

[Фигуры 18А, 18В и 18С] На фигурах 18А, 18В и 18С представлены графические изображения, на которых показаны комбинационные матрицы, полученные с помощью высокопродуктивных скринингов, в которых производится комбинирование DS-8201 с AZD5305, в клеточных линиях NSCLC с низкой или высокой экспрессией HER2.

[Фигуры 19А, 19В и 19С] На фигурах 19А, 19В и 19С представлены графические изображения, на которых показаны комбинационные матрицы, полученные с помощью высокопродуктивных скринингов, в которых производится комбинирование DS-8201 с AZD5305, в клеточной линии рака мочевыводящих путей с экспрессией HER2-мутанта.

Для более легкого понимания настоящего изобретения сначала определены некоторые термины. Во всем подробном описании изложены дополнительные определения.

Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными композициями или стадиями способа, поскольку они могут варьироваться. Используемая в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включают определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Термины в единственном числе, а также “один или несколько” и “по меньшей мере один” можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

Кроме того, выражение “и/или”, где оно используется в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин

“и/или”, используемый в данном документе в такой фразе, как “А и/или В”, включает “А и В”, “А или В”, “А” (отдельно) и “В” (отдельно). Аналогично, подразумевается, что термин “и/или” используемый в такой фразе, как “А, В и/или С” охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Если не определено иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает специалист обычной квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; the Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, которая принята согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты описаны в данном документе формулировкой “содержащий”, также предусмотрены в иных отношениях аналогичные аспекты, описываемые терминами “состоящий из” и/или “состоящий по сути из”.

Термины “ингибировать”, “блокировать” и “супрессировать” используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому статистически значимому уменьшению биологической активности, в том числе к полному блокированию активности. Например, “ингибирование” может относиться к уменьшению биологической активности на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Клеточную пролиферацию можно оценивать с помощью известных в данной области методик, которые позволяют измерять скорость деления клеток и/или фракцию клеток в популяции клеток, проходящих деление, и/или скорость утраты клеток из популяции клеток в связи с терминальной дифференцировкой или гибелью клеток (например, включение тимидина).

Термин “субъект” относится к любому животному (например, млекопитающему), в том числе без ограничения к людям, отличным от человека приматам, грызунам и т. п., которое будет реципиентом конкретного лечения. Как правило, термины “субъект” и “пациент” используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

Термин “фармацевтический продукт” относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет осуществляться биологической активности активных ингредиентов либо в виде композиции, содержащей все активные ингредиенты (для одновременного введения), либо в виде комбинации отдельных композиций (комбинированный препарат), при этом каждая из которых содержит по меньшей мере

один, но не все, из активных ингредиентов (для последовательного или одновременного введения), и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить продукт. Такой продукт может быть стерильным. Под "одновременным введением" подразумевают, что активные ингредиенты вводят в одно и то же время. Под "последовательным введением" подразумевают, что активные ингредиенты вводят друг после друга в любом порядке с временным интервалом между отдельными введениями. Временной интервал может составлять, например, менее 24 часов, предпочтительно менее 6 часов, более предпочтительно менее 2 часов.

Такие термины, как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить", или "облегчение", или "облегчать", относятся как к (1) терапевтическим мероприятиям, с помощью которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или нарушения и/или останавливают его прогрессирование, так и к (2) профилактическим или предупреждающим мероприятиям, с помощью которых предупреждают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, к нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже имеется нарушение; тех, кто предрасположен к развитию нарушения, и тех, у кого необходимо предупредить развитие нарушения. Согласно определенным аспектам субъекта успешно "лечат" от рака в соответствии со способами по настоящему изобретению, если пациент характеризуется, например, полной, частичной или временной ремиссией определенного типа рака.

Термины "рак", "опухоль", "раковый" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом, или описывают его. Примеры видов рака включают без ограничения рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак легкого, рак пищевода, рак головы и шеи, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак желчного протока, болезнь Паджета, рак поджелудочной железы, рак яичника, карциносаркому матки, уротелиальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, гастроинтестинальную стромальную опухоль, стромальную опухоль пищеварительного тракта, рак шейки матки, плоскоклеточную карциному, рак брюшины, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, карциному тела матки, рак почки, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак полового члена, лейкоз, злокачественную лимфому, плазмцитому, миелому, мультиформную глиобластому, остеосаркому, саркому и меланому. Виды рака включают гематологические злокачественные опухоли, такие как острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, и солидные опухоли, такие как рак молочной железы, рак легкого, нейробластому и рак толстой кишки.

Термин "цитотоксическое средство", используемый в данном документе, определяется в широком смысле и относится к веществу, которое ингибирует или

препятствует выполнению функции клеток, и/или вызывает разрушение клеток (гибель клеток), и/или оказывает противоопухолевые/антипролиферативные эффекты. Например, цитотоксическое средство прямо или косвенно предотвращает развитие, созревание или распространение неопластических клеток опухоли. Термин включает также такие средства, которые вызывают только цитостатический эффект, а не только цитотоксический эффект. Термин включает химиотерапевтические средства, описанные ниже, а также другие антагонисты HER2, антиангиогенные средства, ингибиторы тирозинкиназы, ингибиторы протеинкиназы А, представителей семейства цитокинов, радиоактивные изотопы и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения.

Термин "химиотерапевтическое средство" является подмножеством термина "цитотоксическое средство", включающим природные или синтетические химические соединения.

В соответствии со способами или вариантами применения по настоящему изобретению соединения по настоящему изобретению можно вводить пациенту для стимуляции положительного терапевтического ответа в отношении рака. Термин "положительный терапевтический ответ" в отношении лечения рака относится к ослаблению симптомов, ассоциированных с заболеванием. Например, ослабление заболевания можно охарактеризовать как полный ответ. Термин "полный ответ" относится к отсутствию клинически выявляемого заболевания с нормализацией результатов любых проведенных ранее тестов. В качестве альтернативы, ослабление заболевания может быть классифицировано как частичный ответ. Термин "положительный терапевтический ответ" охватывает уменьшение или ингибирование прогрессирования и/или длительности рака, уменьшение или облегчение тяжести рака и/или облегчение одного или нескольких его симптомов в результате введения соединений по настоящему изобретению. В конкретных аспектах такие термины относятся к одному, двум или трем или более результатам после введения соединений по настоящему изобретению:

- (1) стабилизация, уменьшение или устранение популяции раковых клеток;
- (2) стабилизация или снижение степени роста раковой опухоли;
- (3) нарушение формирования раковой опухоли;
- (4) ликвидация, устранение или контроль первичного, местнораспространенного и/или метастатического рака;
- (5) снижение уровня смертности;
- (6) увеличение выживаемости без признаков заболевания, без рецидива, без прогрессирования и/или общей выживаемости, длительности жизни или процента выживаемости;
- (7) увеличение частоты ответа, продолжительности ответа или числа пациентов с ответом или на стадии ремиссии;
- (8) снижение частоты госпитализаций,

(9) снижение времени нахождения на госпитализации,

(10) размер раковой опухоли сохраняется и не увеличивается или увеличивается на менее чем 10%, предпочтительно на менее чем 5%, предпочтительно на менее чем 4%, предпочтительно на менее чем 2%, и

(11) увеличение числа пациентов с ремиссией;

(12) снижение числа вспомогательных видов терапии (например, химиотерапия или гормональная терапия), которые в противном случае требовались бы для лечения рака.

Клинический ответ можно оценивать с применением скрининговых методик, таких как PET, сканирование с помощью магнитно-резонансной визуализации (MRI), рентгенография, сканирование с помощью компьютерной томографии (СТ), анализ с применением проточной цитометрии или клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS), гистология, макропатология и биохимический анализ крови, в том числе без ограничения изменения, выявляемые с помощью ELISA, RIA, хроматографии и т. п. В дополнение к этим положительным терапевтическим ответам, субъект, подвергающийся терапии, может испытывать благотворный эффект в виде ослабления симптомов, ассоциированных с заболеванием.

Алкильные группы и фрагменты представляют собой прямую или разветвленную цепь, например C_{1-8} алкил, C_{1-6} алкил, C_{1-4} алкил или C_{5-6} алкил. Примеры алкильных групп представляют собой метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил и н-октил, такие как метил или н-гексил.

Фторалкильные группы представляют собой алкильные группы, где один или несколько атомов Н замещены одним или несколькими атомами фтора, например C_{1-8} фторалкил, C_{1-6} фторалкил, C_{1-4} фторалкил или C_{5-6} фторалкил. Примеры включают фторметил (CH_2F-), дифторметил (CHF_2-), трифторметил (CF_3-), 2,2,2-трифторэтил (CF_3CH_2-), 1,1-дифторэтил (CH_3CHF_2-), 2,2-дифторэтил (CHF_2CH_2-) и 2-фторэтил (CH_2FCH_2-).

Галоген означает фтор, хлор, бром и йод. В варианте осуществления галоген представляет собой фтор или хлор.

Используемое в данном документе выражение "эффективное количество" означает количество соединения или композиции, которое является достаточным для существенного и положительного изменения подлежащих лечению симптомов и/или состояний (например, обеспечивает положительный клинический ответ). Эффективное количество активного ингредиента для применения в фармацевтическом продукте будет варьироваться в соответствии с конкретным состоянием, подлежащим лечению, тяжестью состояния, длительностью лечения, природой сопутствующей терапии, конкретным(-и) активным(-и) ингредиентом(-ами), подлежащими использованию, конкретным(-и) используемым(-и) фармацевтически приемлемым(-и) вспомогательным(-и) веществом(-ами)/носителем(-ями) и подобными факторами, находящимися в сфере знаний и компетентности лечащего врача. В частности,

эффективное количество соединения для применения в лечении рака в комбинации с конъюгатом антитела и лекарственного средства представляет собой количество, достаточное для ослабления с помощью комбинации симптомов у теплокровного животного, такого как человек, симптомов рака, замедления прогрессирования рака или снижения у пациентов с симптомами рака риска усложнения заболевания.

В настоящем описании, если не указано иное, то используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или дозированным лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями человеческого организма и животных, не вызывая чрезмерную токсичность, раздражение, аллергическую реакцию или другую проблему или осложнение в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Будет понятно, что соединения формулы (I) могут образовывать стабильные фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты или основания, и в таких случаях подходящим может быть введение соединения в виде соли. Примеры солей присоединения кислоты включают ацетат, адипат, аскорбат, бензоат, бензолсульфонат, бикарбонат, бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, холин, цитрат, циклогексилсульфамат, диэтилендиамин, этансульфонат, fumarат, глутамат, гликолят, гемисульфат, 2-гидроксиэтилсульфонат, гепаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, гидроксималеат, лактат, малат, малеат, метансульфонат, меглюмин, 2-нафталинсульфонат, нитрат, оксалат, памоат, персульфат, фенилацетат, фосфат, дифосфат, пикрат, пивалат, пропионат, хинат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфамат, сульфанилат, сульфат, тартрат, тозилат (p-толуолсульфонат), трифторацетат и ундеканоат. Предпочтительными являются нетоксичные физиологически приемлемые соли, хотя другие соли также могут быть пригодными, как, например, для выделения или очистки продукта.

Соли могут быть образованы традиционными способами, например, посредством осуществления реакции продукта в форме свободного основания с одним или несколькими эквивалентами соответствующей кислоты в растворителе или среде, в которой соль является нерастворимой, или в растворителе, таком как вода, который удаляют *in vacuo*, или посредством лиофилизации, или посредством обмена анионов имеющейся соли на другой анион в подходящей ионообменной смоле.

Соединения формулы (I) могут содержать более чем один хиральный центр, и следует понимать, что настоящая заявка охватывает все отдельные стереоизомеры, энантиомеры и диастереоизомеры, а также их смеси. Таким образом, следует понимать, что поскольку соединения формулы (I) могут существовать в оптически активных или рацемических формах благодаря одному или нескольким асимметрическим атомам углерода, настоящая заявка включает в своем определении любую такую оптически активную или рацемическую форму, которая обладает упомянутой выше активностью. Настоящая заявка охватывает все такие стереоизомеры, обладающие активностью,

определенной в данном документе.

Таким образом, по всему тексту описания, где упоминают соединение формулы (I), следует понимать, что термин "соединение" предусматривает диастереоизомеры, смеси диастереоизомеров и энантиомеры, которые являются ингибиторами PARP1.

Также следует понимать, что определенные соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли могут существовать в сольватированной, а также в несольватированной формах, таких как, например, гидратированные и безводные формы. Следует понимать, что соединения в данном документе охватывают все такие сольватированные формы. Для ясности, это включает как сольватированные (например, гидратированные) формы свободной формы соединения, так и сольватированные (например, гидратированные) формы соли соединения.

Некоторые из соединений формулы (I) могут быть кристаллическими и могут иметь более одной кристаллической формы. Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает любую кристаллическую или аморфную форму или их смеси, которые обладают селективной ингибирующей активностью в отношении PARP1. Общеизвестно, что кристаллические материалы можно анализировать с применением традиционных методик, таких как, например, анализ порошковой рентгеновской дифракции (далее в данном документе XRPD) и дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC).

Предполагается, что формула (I), описанная в данном документе, охватывает все изотопы составляющих ее атомов. Например, H (или водород) предусматривает любую изотопную форму водорода, в том числе ^1H , ^2H (D) и ^3H (T); C предусматривает любую изотопную форму углерода, в том числе ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O предусматривает любую изотопную форму кислорода, в том числе ^{16}O , ^{17}O и ^{18}O ; N предусматривает любую изотопную форму азота, в том числе ^{13}N , ^{14}N и ^{15}N ; F предусматривает любую изотопную форму фтора, в том числе ^{19}F и ^{18}F , и т. д. В одном аспекте соединения формулы (I) содержат изотопы атомов, предусмотренные в данном документе, в количествах, соответствующих их содержанию в природе. Однако, в определенных случаях может быть необходимо обогащать один или несколько атомов в конкретном изотопе, который обычно присутствует в меньшем количестве. Например, ^1H обычно содержится в количестве, превышающем 99,98%; однако в одном аспекте соединение любой формулы, представленной в данном документе, может быть обогащено ^2H или ^3H в одном или нескольких положениях, где присутствует H. В другом аспекте, если соединение любой формулы, представленной в данном документе, обогащено радиоактивным изотопом, например, ^3H и ^{14}C , то соединение может являться пригодным для применения в анализах распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Следует понимать, что настоящая заявка охватывает все такие изотопные формы.

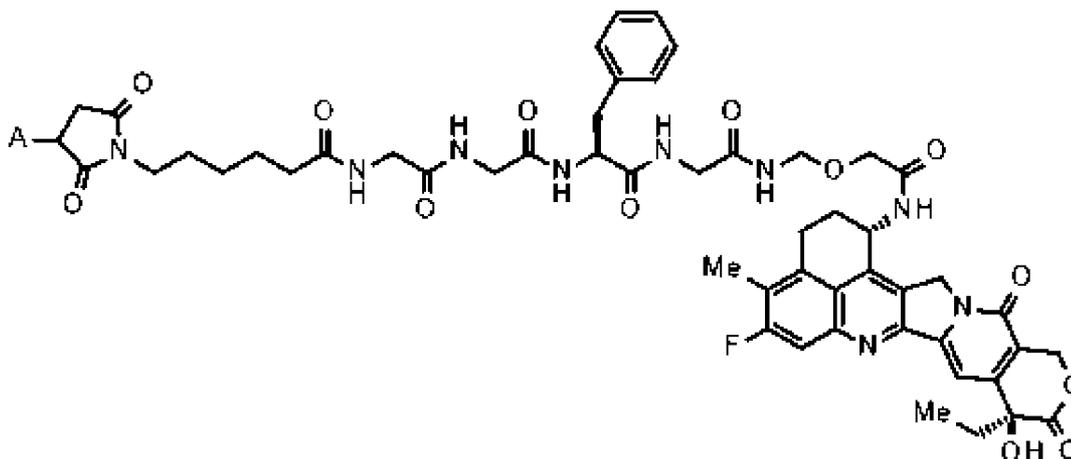
[Описание вариантов осуществления]

Далее в данном документе описаны предпочтительные способы осуществления

настоящего изобретения. Варианты осуществления, описанные ниже, приведены лишь для иллюстрации одного примера типичного варианта осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

1. Конъюгат антитела и лекарственного средства

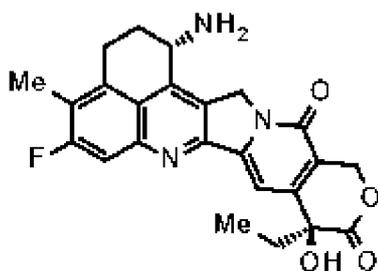
Конъюгат антитела и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственное средство-линкер, представленный следующей формулой:



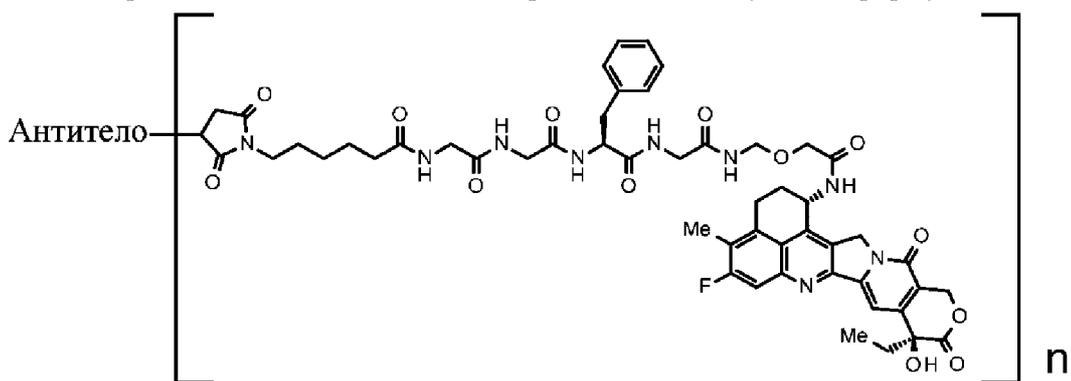
где А представляет собой положение присоединения к антителу, конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи.

В настоящем изобретении частичная структура, состоящая из линкера и лекарственного средства в конъюгате антитела и лекарственного средства, называется "фрагмент лекарственное средство-линкер". Фрагмент лекарственное средство-линкер присоединен к тиольной группе (другими словами атому серы цистеинового остатка), образованной в сайте межцепной дисульфидной связи в антителе (два сайта между тяжелыми цепями, и два сайта между тяжелой цепью и легкой цепью).

Фрагмент лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению предусматривает эксатекан (название по IUPAC: (1S,9S)-1-амино-9-этил-5-фтор-1,2,3,9,12,15-гексагидро-9-гидрокси-4-метил-10Н,13Н-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (также представляется под химическим названием: (1S,9S)-1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1Н,12Н-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13(9Н,15Н)-дион)), который представляет собой ингибитор топоизомеразы I, в качестве компонента. Эксатекан представляет собой производное камптотецина, обладающее противоопухолевым эффектом, представленное следующей формулой:

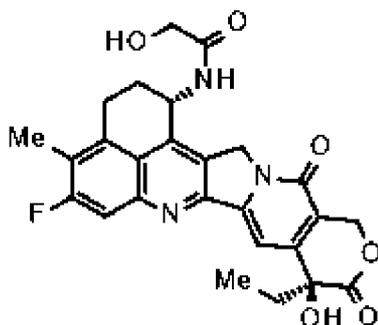


Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, может быть также представлен следующей формулой:



В данном документе фрагмент лекарственное средство-линкер конъюгирован с антителом к HER2 ('антитело-') посредством тиоэфирной связи. Значение n такое же, как и то, что называется средним количеством конъюгированных молекул лекарственного средства (DAR; соотношение лекарственного средства и антитела), и указывает среднее количество звеньев фрагмента лекарственное средство-линкер, конъюгированных на молекулу антитела.

После миграции в раковые клетки, конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, расщепляется в линкерной части с высвобождением соединения, представленного следующей формулой:



Данное соединение предположительно является первоначальным источником противоопухолевой активности конъюгата антитела и лекарственного средства, применяемого в настоящем изобретении, и было подтверждено, что оно обладает ингибирующим эффектом в отношении топоизомеразы I (Ogitani Y. et al., *Clinical Cancer Research*, 2016, Oct 15;22(20):5097-5108, Epub 2016 Mar 29).

Известно, что конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства,

применяемый в настоящем изобретении, обладает эффектом свидетеля (Ogitani Y. et al., *Cancer Science* (2016) 107, 1039-1046). Эффект свидетеля проявляется посредством процесса, с помощью которого конъюгат антитела и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, интернализируется в раковые клетки, экспрессирующие мишень, а затем высвобожденное соединение также оказывает противоопухолевый эффект на раковые клетки, которые присутствуют в ее окружении и не экспрессируют мишень. Данный эффект свидетеля проявляется в виде отличного противоопухолевого эффекта, даже если конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства применяют в комбинации с селективным ингибитором PARP1 в соответствии с настоящим изобретением.

2. Антитело в конъюгате антитела и лекарственного средства

Антитело к HER2 в конъюгате антитела и лекарственного средства, применяемом в настоящем изобретении, может быть получено из любого вида и предпочтительно представляет собой антитело к HER2, полученное из организма человека, крысы, мыши или кролика. В случаях, если антитело получено из организма видов, отличных от человеческого вида, то его предпочтительно подвергают химеризации или гуманизации с применением широко известной методики. Антитело к HER2 может представлять собой поликлональное антитело или моноклональное антитело и предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

Антитело в конъюгате антитела и лекарственного средства, применяемом в настоящем изобретении, представляет собой антитело к HER2, предпочтительно характеризующееся как способное нацеливаться на раковые клетки, и предпочтительно представляет собой антитело, обладающее, например, свойством распознавать раковую клетку, свойством связываться с раковой клеткой, свойством интернализироваться в раковую клетку и/или цитотоксичной активностью в отношении раковых клеток.

Связывающая активность антитела к HER2 в отношении раковых клеток может быть подтверждена с применением проточной цитометрии. Интернализация антитела в раковые клетки может быть подтверждена с применением (1) анализа, представляющего собой визуализацию антитела, включенного в клетки, под флуоресцентным микроскопом с применением вторичного антитела (флуоресцентно меченого), связывающегося с терапевтическим антителом (*Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 751-761), (2) анализа, представляющего собой измерение интенсивности флуоресценции, включенной в клетки, с применением вторичного антитела (флуоресцентно меченого), связывающегося с терапевтическим антителом (*Molecular Biology of the Cell*, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), или (3) анализа Mab-ZAP с применением связывания иммунотоксина с терапевтическим антителом, где токсин высвобождается после внедрения в клетки с подавлением роста клеток (*Bio Techniques* 28: 162-165, January 2000). В качестве иммунотоксина можно применять рекомбинантный сложный белок из каталитического домена дифтерийного токсина и белка G.

Противоопухолевая активность антитела к HER2 может быть подтверждена *in vitro* путем определения подавляющей активности в отношении роста клеток. Например, культивируют линию клеток рака, сверхэкспрессирующую HER2 в качестве белка-мишени для антитела, и в культуральную систему добавляют антитело в различных концентрациях с определением подавляющей активности в отношении образования очага, образования колоний и сферического роста. Противоопухолевую активность можно подтверждать *in vivo*, например, путем введения антитела "голой" мыши с трансплантированной линией клеток рака с высокой экспрессией белка-мишени и определения изменения в раковой клетке.

Поскольку соединение, конъюгированное в конъюгате антитела к HER2 и лекарственного средства, оказывает противоопухолевый эффект, предпочтительно, но не обязательно, чтобы антитело к HER2 само по себе обладало противоопухолевым эффектом. Для специфического и селективного проявления цитотоксической активности противоопухолевого соединения в отношении раковых клеток, важно и также предпочтительно, чтобы антитело к HER2 обладало свойством интернализироваться для миграции в раковые клетки.

Антитело к HER2 в конъюгате антитела и лекарственного средства, применяемом в настоящем изобретении, может быть получено с помощью процедуры, известной из уровня техники. Например, антитело по настоящему изобретению может быть получено с применением способа, обычно проводимого в данной области техники, который включает иммунизацию животных с помощью антигенного полипептида, и сбор, и проведение очистки антител, полученных *in vivo*. Происхождение антигена не ограничено людьми, и животных можно иммунизировать антигеном, полученным из организма отличного от человека животного, такого как мышь, крыса и т. п. В данном случае перекрестная реактивность антител, связывающихся с полученным гетерологичным антигеном, с антигенами человека может быть протестирована с проведением скрининга в отношении антитела, применимого к заболеванию человека.

В качестве альтернативы, клетки, которые продуцируют антитела к антигену, сливают с клетками миеломы в соответствии со способом, известным из уровня техники (например, Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256, p. 495-497 и Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)), с созданием гибридом, из которых, в свою очередь, можно получить моноклональные антитела.

Антиген можно получать путем генетического конструирования клеток-хозяев с получением гена, кодирующего антигенный белок. В частности, векторы, которые обеспечивают экспрессию гена антигена, получают и переносят в клетки-хозяева, так что происходит экспрессия гена. Антиген, экспрессированный таким образом, может быть очищен. Антитело также может быть получено с помощью способа иммунизации животных с помощью вышеописанных генетически сконструированных клеток, экспрессирующих антиген, или клеточной линии, экспрессирующей антиген.

Антитело к HER2 в конъюгате антитела и лекарственного средства,

применяемом в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой рекомбинантное антитело, полученное посредством искусственной модификации с целью уменьшения гетерологичной иммуногенности у людей, такое как химерное антитело или гуманизованное антитело, или предпочтительно представляет собой антитело, содержащее только последовательность гена антитела, полученного из организма человека, то есть антитела человека. Такие антитела можно получать с применением известного способа.

В качестве примера химерного антитела можно привести антитело, в котором переменные и константные области антитела получены из организмов разных видов, например химерное антитело, в котором переменная область антитела, полученная из организма мыши или крысы, присоединена к константной области антитела, полученной из организма человека (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

В качестве примера гуманизованного антитела можно привести антитело, полученное путем включения только области, определяющей комплементарность (CDR), гетерологичного антитела в антитело, полученное из организма человека (Nature (1986) 321, pp. 522-525), и антитело, полученное путем прививания части аминокислотных остатков остова гетерологичного антитела, а также последовательности CDR гетерологичного антитела к антителу человека с помощью способа прививания CDR (WO 90/07861), и антитело, гуманизованное с применением стратегии мутагенеза с конверсией генов (патент США № 5821337).

В качестве примера антитела человека можно привести антитело, созданное с использованием продуцирующей антитела человека мыши, имеющей фрагмент хромосомы человека, включающий гены тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека (см. Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y. et. al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol.10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727 и т. д.). В качестве альтернативы, в качестве примера антитела можно привести антитело, полученное с помощью фагового дисплея, антитело, выбранное из библиотеки антител человека (см. Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)43 (7), p.2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1(2), p.189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109(3), p.427-431 и т. д.).

В настоящем изобретении также включены модифицированные варианты антитела к HER2 в конъюгате антитела и лекарственного средства, применяемом в настоящем изобретении. Модифицированный вариант относится к варианту, полученному путем подвергания антитела в соответствии с настоящим изобретением химической или биологической модификации. Примеры химически модифицированного варианта включают варианты, включающие связывание химического фрагмента с аминокислотным каркасом, варианты, включающие

связывание химического фрагмента с N-связанной или O-связанной углеводной цепью, и т. д. Примеры биологически модифицированного варианта включают варианты, полученные с помощью посттрансляционной модификации (такой как N-связанное или O-связанное гликозилирование, N- или C-концевая обработка, дезамидирование, изомеризация аспарагиновой кислоты или окисление метионина), и варианты, в которых был добавлен метиониновый остаток к N-концу путем обеспечения экспрессии в прокариотической клетке-хозяине. Кроме того, антитело, меченое так, чтобы обеспечивать выявление или выделение антитела или антигена в соответствии с настоящим изобретением, например меченое ферментом антитело, флуоресцентно меченое антитело и аффинно меченое антитело, также включены в определение модифицированного варианта. Такой модифицированный вариант антитела в соответствии с настоящим изобретением является применимым для улучшения стабильности и удержания антитела в крови, снижения его иммуногенность, выявления или выделения антитела или антигена и т. д.

Кроме того, путем регулирования модификации гликана, который связан с антителом в соответствии с настоящим изобретением (гликозилирование, дефукозилирование и т. д.), можно усиливать антителозависимую цитотоксическую активность в отношении клеток. В качестве методики регулирования модификации гликана антител известны раскрытые в WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, WO 2007/133855, WO 2013/120066 и т. д. Однако, методика ими не ограничена. В антитело к HER2 в соответствии с настоящим изобретением также включены антитела, в которых регулируют модификацию гликана.

Известно, что лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела, полученного в культивированных клетках млекопитающих, удален (*Journal of Chromatography A*, 705: 129-134 (1995)), и также известно, что два аминокислотных остатка (глицин и лизин) на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела, полученного в культивированных клетках млекопитающих, удалены, а пролиновый остаток, только что размещенный на карбоксильном конце, амидирован (*Analytical Biochemistry*, 360: 75-83 (2007)). Однако, такая делеция и модификация последовательности тяжелой цепи не влияет на аффинность связывания антигена и эффекторную функцию антитела (активацию комплемента, антителозависимую клеточную цитотоксичность и т. д.). Следовательно, в антитело к HER2 в соответствии с настоящим изобретением также включены антитела, подвергшиеся такой модификации, и функциональные фрагменты антител, и также включены варианты с делециями, в которых одна или две аминокислоты были удалены на карбоксильном конце тяжелой цепи, варианты, полученные путем амидирования вариантов с делециями (например, тяжелая цепь, в которой пролиновый остаток на карбоксильном конце был амидирован), и т. п. Тип варианта с делецией, содержащего делецию на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела к HER2 в соответствии с настоящим изобретением, не ограничен описанными выше вариантами при условии сохранения аффинности связывания антигена и

эффektorной функции. Две тяжелые цепи, составляющие антитело в соответствии с настоящим изобретением, могут быть одного типа, выбранного из группы, состоящей из полноразмерной тяжелой цепи и вышеописанного варианта с делецией, или могут быть двух типов в комбинации, выбранных из них. На соотношение количества каждого варианта с делецией может влиять тип культивированных клеток млекопитающих, которые продуцируют антитело к HER2 в соответствии с настоящим изобретением, и условия культивирования; однако, антитело, в котором один аминокислотный остаток на карбоксильном конце был удален в обеих из двух тяжелых цепей в антителе в соответствии с настоящим изобретением, может быть приведен в качестве предпочтительного примера.

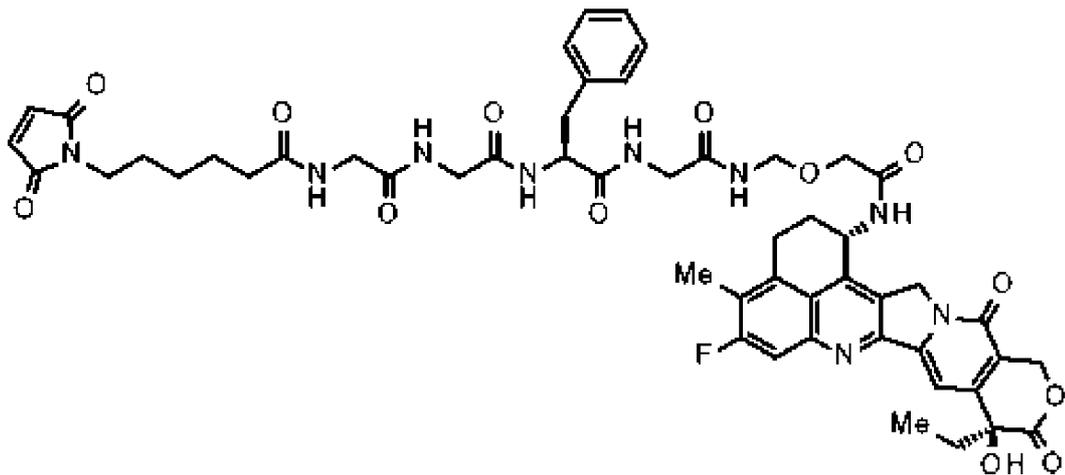
В качестве примера изоформ антитела к HER2 в соответствии с настоящим изобретением могут быть приведены, например, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), а IgG1 или IgG2 могут быть приведены в качестве предпочтительных примеров.

В настоящем изобретении термин "антитело к HER2" относится к антителу, которое специфически связывается с HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа; ErbB-2) и предпочтительно обладает активностью интернализации в HER2-экспрессирующих клетках посредством связывания с HER2.

Примеры антитела к HER2 включают трастузумаб (патент США № 5821337) и пертузумаб (WO 01/00245), и трастузумаб может быть приведен в качестве предпочтительного примера.

3. Получение конъюгата антитела и лекарственного средства

Промежуточное соединение лекарственное средство-линкер для применения в получении конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением представлено следующей формулой:



Промежуточное соединение лекарственное средство-линкер может быть представлено под химическим названием N-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноил]глицилглицил-L-фенилаланил-N-[(2-[[[(1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-1-ил]амино}-2-

оксоэтокси)метил]глицинамид и может быть получено, со ссылкой на описания в WO 2014/057687, WO 2015/098099, WO 2015/115091, WO 2015/155998, WO 2019/044947 и так далее.

Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, может быть получен путем осуществления реакции вышеописанного промежуточного соединения лекарственное средство-линкер и антитела к HER2, содержащего тиольную группу (также называемую сульфгидрильной группой).

Антитело к HER2, содержащее сульфгидрильную группу, может быть получено с помощью способа, широко известного в уровне техники (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Например, путем применения 0,3-3 молярных эквивалентов восстановителя, такого как гидрохлорид трис(2-карбок시에тил)фосфина (TCEP), на межцепной дисульфид в антителе и осуществления реакции с антителом в буферном растворе, содержащем хелатообразующее средство, такое как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), может быть получено антитело к HER2, содержащее сульфгидрильную группу с частично или полностью восстановленными межцепными дисульфидами в антителе.

Кроме того, путем применения 2-20 молярных эквивалентов промежуточного соединения лекарственное средство-линкер на антитело к HER2, содержащее сульфгидрильную группу, может быть получен конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, в котором конъюгированы 2-8 молекул лекарственного средства на молекулу антитела.

Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела к HER2 в полученном конъюгате антитела и лекарственного средства может быть определено, например, с помощью способа расчета на основе измерения поглощения УФ для конъюгата антитела и лекарственного средства и предшественника этого конъюгата при двух длинах волны 280 нм и 370 нм (УФ-способ) или способа расчета на основе количественного определения посредством измерения с помощью HPLC фрагментов, полученных путем обработки конъюгата антитела и лекарственного средства восстановителем (способ HPLC).

Конъюгация между антителом к HER2 и промежуточным соединением лекарственное средство-линкер и расчет среднего количества конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в конъюгате антитела и лекарственного средства могут быть осуществлены со ссылкой на описания в WO 2014/057687, WO 2015/098099, WO 2015/115091, WO 2015/155998, WO 2017/002776, WO 2018/212136 и так далее.

В настоящем изобретении термин "конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства" относится к такому конъюгату антитела и лекарственного средства, где антитело в конъюгате антитела и лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело к HER2.

Антитело к HER2 предпочтительно представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 26-33 из SEQ ID NO: 1, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 51-58 из SEQ ID NO: 1, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 97-109 из SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, содержащую CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 27-32 из SEQ ID NO: 2, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 50-52 из SEQ ID NO: 2, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 89-97 из SEQ ID NO: 2, и более предпочтительно антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 1-120 из SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 1-107 из SEQ ID NO: 2, и еще более предпочтительно антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, или антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотных остатков 1-449 из SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из всех аминокислотных остатков 1-214 из SEQ ID NO: 2.

Среднее количество звеньев фрагмента лекарственное средство-линкер, конъюгированных на молекулу антитела в конъюгате антитела к HER2 и лекарственного средства, составляет предпочтительно 2-8, более предпочтительно 3-8, еще более предпочтительно 7-8, еще более предпочтительно 7,5-8 и еще более предпочтительно приблизительно 8.

Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, может быть получен со ссылкой на описания в WO 2015/115091 и так далее.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой трастузумаб дерукстекан (DS-8201).

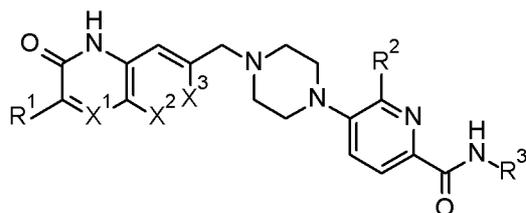
4. Селективный ингибитор PARP1

В настоящем изобретении термин "селективный ингибитор PARP1" относится к ингибитору PARP, который проявляет селективность в отношении PARP1 по сравнению с другими членами семейства PARP, такими как PARP2, PARP3, PARP5a и PARP6, преимущественно селективность в отношении PARP1 по сравнению с PARP2, предпочтительно по меньшей мере 10-кратную селективность в отношении PARP1 по сравнению с PARP2, и более предпочтительно по меньшей мере 100-кратную

селективность в отношении PARP1 по сравнению с PARP2. Предпочтительные примеры селективных ингибиторов PARP1 могут включать таковые, раскрытые в данном документе.

Примеры селективных ингибиторов PARP1, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают азахинолоновые соединения формулы (I). Азахинолоновые соединения формулы (I), описанные в данном документе, характеризуются неожиданно высокой селективностью в отношении PARP1 по сравнению с другими представителями семейства PARP, такими как PARP2, PARP3, PARP5a и PARP6. Преимущественно, соединения формулы (I), описанные в данном документе, характеризуются низкой активностью в отношении hERG. Хорошо известно, что блокирование сердечного ионного канала, кодируемого геном человека, родственным гену ether-à-gogo (hERG), представляет собой фактор риска при открытии и разработке лекарственного средства, и что блокировка hERG может вызвать проблемы с безопасностью, такие как сердечная аритмия.

Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления селективного ингибитора PARP1, применяемого в настоящем изобретении, селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой (I),



(I),

где

каждый из X¹ и X² независимо выбран из N и C(H),

X³ независимо выбран из N и C(R⁴), где R⁴ представляет собой H или фтор,

R¹ представляет собой C₁₋₄алкил или C₁₋₄фторалкил (предпочтительно представляет собой этил),

R² независимо выбран из H, галогена, C₁₋₄алкила и C₁₋₄фторалкила, и

R³ представляет собой H или C₁₋₄алкил (предпочтительно представляет собой C₁₋₄алкил, более предпочтительно метил),

или его фармацевтически приемлемую соль,

при условии, что

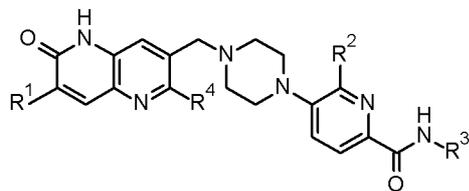
если X¹ представляет собой N, то X² представляет собой C(H), и X³ представляет собой C(R⁴),

если X² представляет собой N, то X¹ представляет собой C(H), и X³ представляет собой C(R⁴), и

если X³ представляет собой N, то X¹ и X² одновременно представляют собой

C(H).

В одном варианте осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение формулы (Ia),

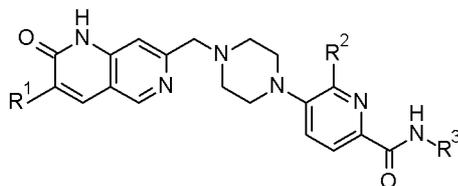


(Ia),

где

R¹ представляет собой C₁₋₄алкил, R² выбран из H, галогена, C₁₋₄алкила и C₁₋₄фторалкила (предпочтительно выбран из дифторметила, трифторметила и метила или представляет собой H или галоген), R³ представляет собой H или C₁₋₄алкил, и R⁴ представляет собой H. В соединении формулы (Ia), предпочтительно R¹ представляет собой этил, R² выбран из H, хлора и фтора, R³ представляет собой метил, и R⁴ представляет собой H.

В другом варианте осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение формулы (Ib),

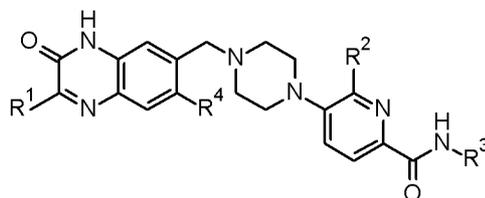


(Ib),

где

R¹ представляет собой C₁₋₄алкил, R² представляет собой H или галоген, и R³ представляет собой H или C₁₋₄алкил. В соединении формулы (Ib), предпочтительно R¹ представляет собой этил, R² выбран из H, хлора и фтора, и R³ представляет собой метил.

В другом варианте осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение формулы (Ic),



(Ic),

где

R¹ представляет собой C₁₋₄алкил или C₁₋₄фторалкил, R² независимо выбран из H, галогена, C₁₋₄алкила и C₁₋₄фторалкила,

R³ представляет собой H или C₁₋₄алкил, и R⁴ представляет собой H или фтор.

В другом варианте осуществления селективный ингибитор PARP1 представляет

собой соединение формулы (Ic), где

R^1 независимо выбран из этила, н-пропила, трифторметила, 1,1-дифторэтила, 2,2-дифторэтила, 2-фторэтила и 2,2,2-трифторэтила; R^2 независимо выбран из H, метила, этила, трифторметила, дифторметила, фторметила, фтора и хлора; R^3 представляет собой H или метил, и R^4 представляет собой H.

В другом варианте осуществления селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение формулы (I) или формулы (Ia), (Ib) или (Ic), характеризующаясь селективностью в отношении PARP1 по сравнению с PARP2, предпочтительно по меньшей мере 10-кратной селективностью в отношении PARP1 по сравнению с PARP2, и более предпочтительно по меньшей мере 100-кратной селективностью в отношении PARP1 по сравнению с PARP2.

В других вариантах осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение, выбранное из:

5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

6-хлор-5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

6-хлор-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

6-этил-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида,

6-(дифторметил)-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамида,

6-хлор-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-

метилпиридин-2-карбоксамида,

N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

6-хлор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

6-фтор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

6-хлор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

6-фтор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(2-этил-7-фтор-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[[2-(1,1-дифторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[[2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[[2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[[2-(2-фторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

6-фтор-5-[4-[[2-(2-фторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида и

6-фтор-N-метил-5-(4-((3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-3,4-дигидрохиноксалин-6-ил)метил)пиперазин-1-ил)пиколинамида,

или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение, выбранное из:

6-(дифторметил)-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида,

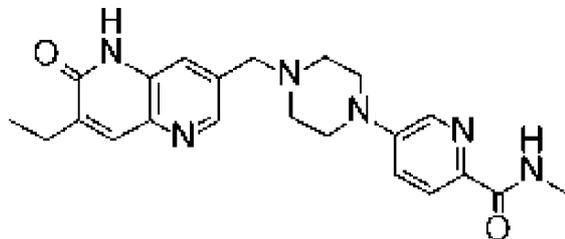
5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида,

5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамида и

N-этил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида,

или его фармацевтически приемлемую соль.

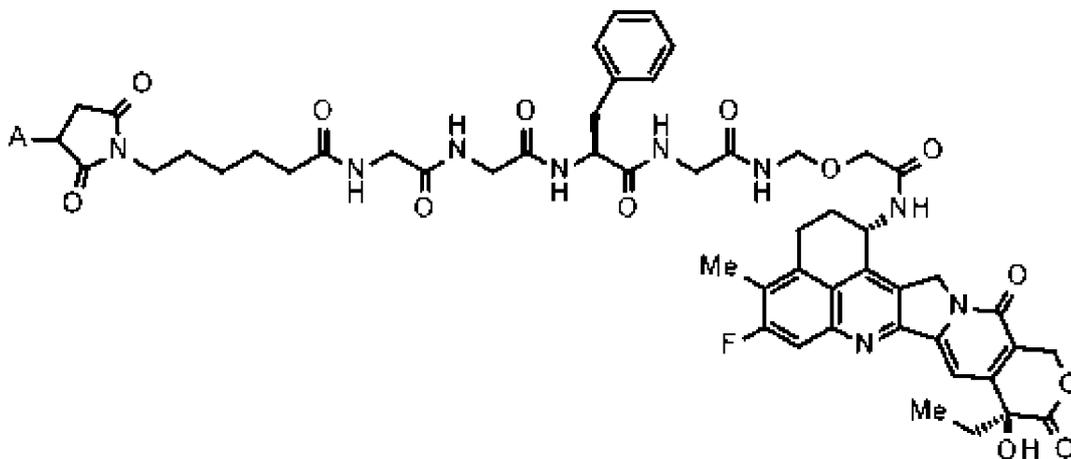
В предпочтительном варианте осуществления селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамид), представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

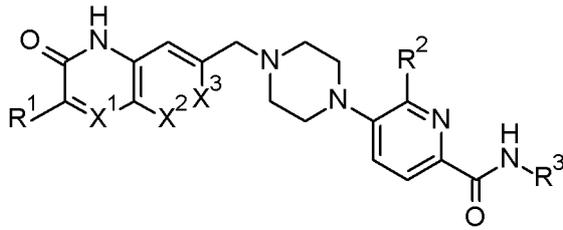
5. Комбинация конъюгата антитела и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1

В первом варианте осуществления комбинации настоящего изобретения конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который комбинирован с селективным ингибитором PARP1, представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственное средство-линкер представлен следующей формулой:



где А представляет собой положение присоединения к антителу, конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, определенный выше для первого варианта осуществления комбинации, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который представляет собой соединение, представленное следующей формулой (I),



(I),

где

каждый из X^1 и X^2 независимо выбран из N и C(H), X^3 независимо выбран из N и C(R^4), где R^4 представляет собой H или фтор, R^1 представляет собой C_{1-4} алкил или C_{1-4} фторалкил, R^2 независимо выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила, и R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил,

или его фармацевтически приемлемую соль,

при условии, что

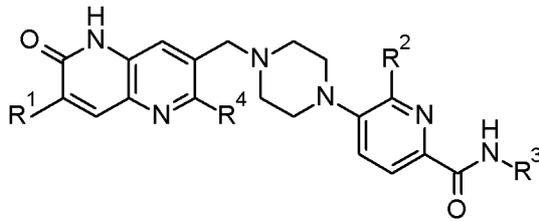
если X^1 представляет собой N, то X^2 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4),если X^2 представляет собой N, то X^1 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4), иесли X^3 представляет собой N, то X^1 и X^2 одновременно представляют собой C(H).

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который определен выше, где в формуле (I) R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который определен выше, где в формуле (I) R^3 представляет собой метил.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который определен выше, где в формуле (I) R^1 представляет собой этил.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который представляет собой соединение, представленное следующей формулой (Ia),



(Ia),

где

R^1 представляет собой C_{1-4} алкил,

R^2 выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила,

R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил, и

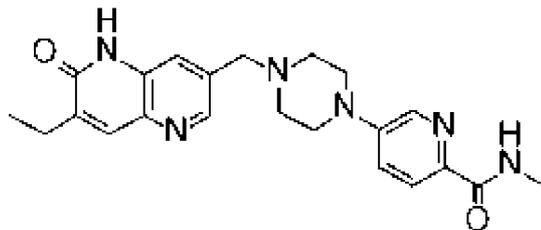
R^4 представляет собой H,

или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который определен выше, где в формуле (I) R^2 представляет собой H или галоген.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, который определен выше, где в формуле (I) R^1 представляет собой этил, R^2 выбран из H, хлора и фтора, и R^3 представляет собой метил.

В другом варианте осуществления комбинации конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, который определен выше, комбинирован с селективным ингибитором PARP1, где селективный ингибитор PARP1 представляет собой AZD5305, представленный следующей формулой:

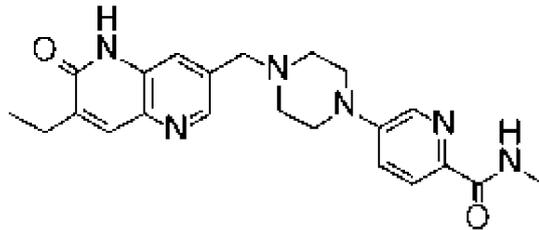


или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления каждого из вариантов осуществления комбинации, описанных выше, антитело к HER2 содержит тяжелую цепь, содержащую CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 3, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 5, и легкую цепь, содержащую CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 6, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных

остатков 1-3 из SEQ ID NO: 7, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления каждого из вариантов осуществления комбинации, описанных выше, антитело к HER2 содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления каждого из вариантов осуществления комбинации, описанных выше, антитело к HER2 содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления каждого из вариантов осуществления комбинации, описанных выше, антитело к HER2 содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

В особым образом предпочтительном варианте осуществления комбинации настоящего изобретения конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой трастузумаб дерукстекан (DS-8201), а селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой:



, также известное как AZD5305.

6. Терапевтическое комбинированное применение и способ

Далее описаны фармацевтический продукт, и терапевтическое применение, и способ, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением и селективный ингибитор PARP1 вводят в комбинации.

Фармацевтический продукт, и терапевтическое применение, и способ по настоящему изобретению могут характеризоваться тем, что конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 по отдельности содержатся в качестве активных компонентов в разных составах, и их вводят одновременно или в разные моменты времени, или они могут характеризоваться тем, что конъюгат антитела и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 содержатся и вводятся в качестве активных компонентов в одном составе.

В фармацевтическом продукте и терапевтическом способе по настоящему изобретению отдельный селективный ингибитор PARP1, применяемый в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с конъюгатом антитела к HER2 и лекарственного средства, или два или более разных селективных ингибиторов PARP1

можно вводить в комбинации с конъюгатом антитела и лекарственного средства.

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению можно применять для лечения рака и предпочтительно можно применять для лечения по меньшей мере одного вида рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы (в том числе трижды негативного рака молочной железы и люминального рака молочной железы), рака желудка (также называемого аденокарциномой желудка), колоректального рака (также называемого раком толстой и прямой кишки и включающего рак толстой кишки и рак прямой кишки), рака легкого (в том числе мелкоклеточного рака легкого и немелкоклеточного рака легкого), рака пищевода, рака головы и шеи (в том числе рака слюнной железы и рака глотки), аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока (в том числе рака желчевыводящих путей), болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмоцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы, и более предпочтительно можно применять для лечения по меньшей мере одного вида рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого (предпочтительно немелкоклеточного рака легкого), рака поджелудочной железы, рака яичника, рака предстательной железы и рака почки.

Присутствие или отсутствие опухолевых маркеров HER2 может быть определено, например, путем сбора опухолевой ткани у пациента с раком с подготовкой зафиксированных в формалине образцов, погруженных в парафин (FFPE), и подвергания образцов тестированию в отношении генных продуктов (белков), например с помощью иммуногистохимического (ИHC) способа, проточной цитометрии или вестерн-блоттинга, или тестированию в отношении транскрипции генов, например с помощью способа гибридизации *in situ* (ISH), способа количественной ПЦР (q-PCR) или анализа на микрочипах, или путем сбора бесклеточной циркулирующей опухолевой ДНК (ctDNA) у пациента с раком и подвергания ctDNA тестированию с помощью способа, такого как секвенирование следующего поколения (NGS).

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению можно применять для экспрессирующего HER2 рака, который может представлять собой сверхэкспрессирующий (сильно или умеренно) HER2 рак или может представлять собой рак с низкой экспрессией HER2.

В настоящем изобретении термин "сверхэкспрессирующий HER2 рак", в частности, не ограничен до тех пор, пока специалист в данной области считает его сверхэкспрессирующим HER2 раком. Предпочтительные примеры

сверхэкспрессирующего HER2 рака могут включать рак, которому присвоен балл 3+ в отношении экспрессии HER2 в способе ИНС, и рак, которому присвоен балл 2+ в отношении экспрессии HER2 в способе ИНС и который определен как положительный в отношении экспрессии HER2 в способе гибридизации *in situ* (ISH). Способ гибридизации *in situ* по настоящему изобретению предусматривает способ флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и способ двухцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (DISH).

В настоящем изобретении термин "рак с низкой экспрессией HER2", в частности, не ограничен до тех пор, пока специалист в данной области считает его раком с низкой экспрессией HER2. Предпочтительные примеры рака с низкой экспрессией HER2 могут включать рак, которому присвоен балл 2+ в отношении экспрессии HER2 в способе ИНС и который определен как отрицательный в отношении экспрессии HER2 в способе гибридизации *in situ*, и рак, которому присвоен балл 1+ в отношении экспрессии HER2 в способе ИНС.

Способ выставления баллов экспрессии HER2 с помощью способа ИНС или способ определения положительности или отрицательности экспрессии HER2 в способе гибридизации *in situ*, в частности, не ограничены до тех пор, пока они признаются специалистом в данной области. Примеры способа могут включать способ, описанный в 4-м издании руководства по тестированию HER2, для рака молочной железы (разработанный Японским сообществом по патологии для оптимального применения HER2 в отношении рака молочной железы).

Рак, в частности в отношении лечения рака молочной железы, может представлять собой сверхэкспрессирующий HER2 (сильно или умеренно) рак молочной железы, или рак молочной железы с низкой экспрессией HER2, или трижды негативный рак молочной железы, и/или может характеризоваться баллом статуса HER2, составляющим 3+ согласно ИНС, составляющим 2+ согласно ИНС, составляющим 1+ согласно ИНС или составляющим больше 0 и меньше 1+ согласно ИНС.

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению предпочтительно можно применять для млекопитающего, но более предпочтительно их применяют для человека.

Противоопухолевый эффект фармацевтического продукта и терапевтического способа по настоящему изобретению можно подтверждать путем трансплантации раковых клеток подопытному животному-субъекту с получением модели и измерения снижения объема опухоли или эффекта, представляющего собой продолжение срока жизни, в результате применения фармацевтического продукта и терапевтического способа по настоящему изобретению. А затем эффект комбинированного применения конъюгата антитела и лекарственного средства, применяемого в настоящем изобретении, и селективного ингибитора PARP1 можно подтверждать путем сравнения противоопухолевого эффекта в результате отдельного введения конъюгата антитела и лекарственного средства, применяемого в настоящем изобретении, и такового в

результате селективного ингибитора PARP1.

Противоопухолевый эффект фармацевтического продукта и терапевтического способа по настоящему изобретению может быть подтвержден в клиническом испытании с применением любого из способов оценки с использованием Критериев оценки ответа солидных опухолей на лечение (RECIST), способа оценки ВОЗ, способа оценки Макдональда, измерения веса тела и других подходов и может быть определен на основе показателей полного ответа (CR), частичного ответа (PR); прогрессирующего заболевания (PD), объективной степени ответа (ORR), длительности ответа (DoR), выживания без прогрессирования (PFS), общего выживания (OS) и так далее.

Путем применения указанных выше способов может быть подтверждено превосходство противоопухолевого эффекта у фармацевтического продукта и терапевтического способа по настоящему изобретению над существующими на сегодняшний день фармацевтическими продуктами и терапевтическими способами для лечения рака.

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению может задерживать развитие раковых клеток, подавлять их рост и дополнительно уничтожать раковые клетки. Такие эффекты могут обеспечивать освобождение от симптомов, вызванных раком, у пациентов с раком или достижение улучшения качества жизни (QOL) у пациентов с раком и обеспечивать терапевтический эффект путем поддержания жизни пациентов с раком. Даже если фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению не обеспечивают уничтожение раковых клеток, они могут обеспечивать достижение более высокого QOL у пациентов с раком с достижением более длительного выживания за счет подавления или контролирования роста раковых клеток.

Ожидается, что фармацевтический продукт по настоящему изобретению может оказывать терапевтический эффект путем применения в отношении пациентов в качестве системной терапии и, кроме того, путем местного применения в отношении раковых тканей.

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению, в другом аспекте, предусмотрены для применения в качестве вспомогательного средства при терапии рака с помощью ионизирующего излучения или других химиотерапевтических средств. Например, при лечении рака лечение может предусматривать введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества фармацевтического продукта одновременно или последовательно с ионизирующим излучением или другими химиотерапевтическими средствами.

Фармацевтический продукт и терапевтический способ по настоящему изобретению можно применять в качестве вспомогательного средства химиотерапии, комбинированного с хирургической операцией. Фармацевтический продукт по настоящему изобретению можно вводить с целью снижения размера опухоли перед

хирургической операцией (что называется предоперационной адъювантной химиотерапией или неoadъювантной терапией) или можно вводить с целью предупреждения повторного возникновения опухоли после хирургической операции (что называется послеоперационной адъювантной химиотерапией или адъювантной терапией).

В дополнительных аспектах фармацевтический продукт по настоящему изобретению можно применять для лечения рака, который характеризуется дефицитом активности репарации DSB ДНК, зависящей от гомологичной рекомбинации (HR). По HR-зависимому пути репарации DSB ДНК осуществляется репарация двухнитевых разрывов (DSB) в ДНК посредством механизмов гомологичной рекомбинации с повторным образованием непрерывной спирали ДНК (K.K. Khanna and S.P. Jackson, *Nat. Genet.* 27(3): 247-254 (2001)). Компоненты зависимого от HR пути репарации DSB ДНК включают без ограничения ATM (NM_000051), RAD51 (NM_002875), RAD51L1 (NM_002877), RAD51C (NM_002876), RAD51L3 (NM_002878), DMC1 (NM_007068), XRCC2 (NM_005431), XRCC3 (NM_005432), RAD52 (NM_002879), RAD54L (NM_003579), RAD54B (NM_012415), BRCA1 (NM_007295), BRCA2 (NM_000059), RAD50 (NM_005732), MRE11A (NM_005590) и NBS1 (NM_002485). Другие белки, вовлеченные в зависимый от HR путь репарации DSB ДНК, предусматривают регуляторные факторы, такие как EMSY (Hughes-Davies, et al., *Cell*, **115**, pp523-535). Компоненты HR также описаны в Wood, et al., *Science*, **291**, 1284-1289 (2001). Рак, при котором имеет место дефект зависимой от HR репарации DSB ДНК, может предусматривать одну или несколько раковых клеток, которые обладают сниженной или аннулированной способностью к репарации DSB ДНК посредством данного пути по сравнению с нормальными клетками, или быть выраженным ими, т. е. активность зависимого от HR пути репарации DSB ДНК может быть снижена или нарушена в одной или нескольких раковых клетках. Активность одного или нескольких компонентов зависимого от HR пути репарации DSB ДНК может быть нарушена в одной или нескольких раковых клетках индивидуума, у которого имеется рак, при котором имеет место дефект зависимой от HR репарации DSB ДНК. Компоненты зависимого от HR пути репарации DSB ДНК хорошо охарактеризованы в уровне техники (см., например, Wood, et al., *Science*, **291**, 1284-1289 (2001)) и включают компоненты, перечисленные выше.

В некоторых вариантах осуществления раковые клетки могут иметь фенотип, дефектный в отношении BRCA1 и/или BRCA2, т. е. в раковых клетках снижена или нарушена активность BRCA1 и/или BRCA2. Раковые клетки с данным фенотипом могут являться дефектными в отношении BRCA1 и/или BRCA2, т. е. в раковых клетках может быть снижена или нарушена экспрессия и/или активность BRCA1 и/или BRCA2, например, посредством мутации или полиморфизма в кодирующей нуклеиновой кислоте или посредством амплификации, мутации или полиморфизма в гене, кодирующем регуляторный фактор, например, в гене EMSY, который кодирует

регуляторный фактор BRCA2 (Hughes-Davies, et al., Cell, **115**, 523-535). BRCA1 и BRCA2 представляют собой известные супрессоры опухолевого роста, аллели дикого типа которых часто теряются при опухолях у гетерозиготных носителей (Jasin M., Oncogene, **21(58)**, 8981-93 (2002); Tutt, et al., Trends Mol Med., **8 (12)**, 571-6, (2002)). Связь наличия мутаций в BRCA1 и/или BRCA2 с раком молочной железы хорошо охарактеризована в уровне техники (Radice, P.J., Exp Clin Cancer Res., **21(3 Suppl)**, 9-12 (2002)). Также известно, что амплификация гена EMSY, который кодирует BRCA2-связывающий фактор, ассоциирована с раком молочной железы и раком яичника. Носители мутаций в BRCA1 и/или BRCA2 также подвержены повышенному риску развития определенных видов рака, в том числе рака молочной железы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака желудочно-кишечного тракта и рака легкого. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является гетерозиготным в отношении одной или нескольких вариаций, таких как мутации и полиморфизмы, в BRCA1 и/или BRCA2 или их регуляторе. Выявление вариации в BRCA1 и BRCA2 является хорошо известным из уровня техники и описано, например, в EP 699754, EP 705903, Neuhausen, S.L. and Ostrander, E.A., Genet. Test, **1**, 75-83 (1992); Chappnis, P.O. and Foulkes, W.O., Cancer Treat Res, **107**, 29-59 (2002); Janatova M., et al., Neoplasma, 50(4), 246-505 (2003); Jancarkova, N., Ceska Gynecol., **68(1)**, 11-6 (2003)). Определение амплификации гена, кодирующего BRCA2-связывающий фактор EMSY, описано в Hughes-Davies, et al., Cell, **115**, 523-535).

Мутации и полиморфизмы, ассоциированные с раком, могут быть выявлены на уровне нуклеиновой кислоты посредством выявления наличия вариантной последовательности нуклеиновой кислоты или на уровне белка посредством выявления наличия вариантного (т. е. мутантного или аллельного варианта) полипептида.

Можно вводить фармацевтический продукт по настоящему изобретению, при этом он содержит по меньшей мере один фармацевтически подходящий ингредиент. Фармацевтически подходящим ингредиентом может быть соответствующим образом выбранное и примененное вещество из добавок для составления или т. п., которые в общем применяют в данной области техники, в соответствии с дозой, вводимой концентрацией или т. п. конъюгата антитела и лекарственного средства, применяемого в настоящем изобретении, и селективного ингибитора PARP1. Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, можно вводить, например, в виде фармацевтического продукта, содержащего буфер, такой как гистиридиновый буфер, носитель, такой как сахароза и трегалоза, и поверхностно-активное вещество, такое как полисорбаты 80 и 20. Фармацевтический продукт, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, предпочтительно можно применять в виде инъекции, более предпочтительно можно применять в виде водной инъекции или лиофилизированной инъекции и еще более предпочтительно можно применять в виде лиофилизированной

инъекции. В случае, где фармацевтический продукт, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой водную инъекцию, водную инъекцию предпочтительно можно разбавлять подходящим разбавителем, а затем предоставлять в виде внутривенной инфузии. Примеры разбавителя могут включать раствор декстрозы и физиологический солевой раствор, в качестве предпочтительного примера можно привести раствор декстрозы, и в качестве более предпочтительного примера можно привести 5% раствор декстрозы. В случае, где фармацевтический продукт по настоящему изобретению представляет собой лиофилизированную инъекцию, необходимое количество лиофилизированной инъекции, заранее растворенной в воде для инъекций, предпочтительно можно разбавлять подходящим разбавителем, а затем предоставлять в виде внутривенной инфузии. Примеры разбавителя могут включать раствор декстрозы и физиологический солевой раствор, в качестве предпочтительного примера можно привести раствор декстрозы, и в качестве более предпочтительного примера можно привести 5% раствор декстрозы.

Примеры путей введения, применимых для введения фармацевтического продукта по настоящему изобретению, могут включать внутривенный, внутрикожный, подкожный, внутримышечный и внутрибрюшинный пути, и при этом внутривенные пути являются предпочтительными.

Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, можно вводить человеку с интервалами от 1 до 180 дней, предпочтительно можно вводить с интервалами в неделю, две недели, три недели или четыре недели, и более предпочтительно можно вводить с интервалами в три недели. Конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, применяемый в настоящем изобретении, можно вводить в дозе, составляющей от приблизительно 0,001 до 100 мг/кг на введение, и предпочтительно можно вводить в дозе, составляющей от 0,8 до 12,4 мг/кг на введение. Например, конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства можно вводить один раз каждые три недели в дозе, составляющей 0,8 мг/кг, 1,6 мг/кг, 3,2 мг/кг, 5,4 мг/кг, 6,4 мг/кг, 7,4 мг/кг или 8 мг/кг, и предпочтительно можно вводить один раз каждые три недели в дозе, составляющей 5,4 мг/кг или 6,4 мг/кг.

Селективный ингибитор PARP1 можно вводить в подходящей дозе с помощью любого подходящего пути введения. Размер дозы, необходимой для терапевтического лечения конкретного болезненного состояния, неизбежно будет варьироваться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, пути введения и тяжести заболевания, подвергаемого лечению. В отношении дополнительной информации о путях введения и схемах введения доз можно сослаться на главу 25.3 в томе 5 книги "Комплексная медицинская химия" (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли обычно вводят пероральным путем в форме фармацевтических препаратов, содержащих

активный ингредиент или его фармацевтически приемлемую соль или сольват или сольват такой соли в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от нарушения и пациента, подлежащего лечению, композиции можно вводить при различных дозах.

Фармацевтические составы на основе соединения формулы (I), описанные выше, могут быть получены для перорального введения, в частности в форме таблеток или капсул, и особенно с применением технологий, направленных на обеспечение целенаправленного высвобождения лекарственного средства в толстом кишечнике (Patel, M. M. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011, 8 (10), 1247-1258).

Фармацевтические составы на основе соединения формулы (I), описанные выше, в целях удобства можно вводить в стандартной лекарственной форме, и их можно получать посредством любого из способов, хорошо известных в области фармацевтики, например, как описано в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985).

Фармацевтические составы на основе соединения формулы (I), подходящие для перорального введения, могут содержать один или несколько физиологически совместимых носителей и/или вспомогательных веществ и могут находиться в твердой или жидкой форме. Таблетки и капсулы можно получать с применением связывающих средств, наполнителей, смазывающих средств и/или поверхностно-активных веществ, таких как лаурилсульфат натрия. Жидкие композиции могут содержать традиционные добавки, такие как суспендирующие средства, эмульгирующие средства и/или консерванты. Жидкие композиции могут быть инкапсулированы, например, в желатин, с получением стандартной лекарственной формы. Твердые лекарственные формы для перорального введения включают таблетки, двустворчатые капсулы с твердой оболочкой и мягкие эластичные желатиновые (SEG) капсулы. Такие двустворчатые капсулы с твердой оболочкой можно получать, например, посредством заполнения соединением формулы (I) желатиновой или гидроксипропилметилцеллюлозной (HPMC) оболочки.

Состав сухой оболочки соединения формулы (I), как правило, содержит желатин в концентрации от приблизительно 40% до 60% вес/вес, смягчитель в концентрации от приблизительно 20% до 30% (такой как глицерин, сорбит или пропиленгликоль) и воду в концентрации от приблизительно 30% до 40%. Также могут присутствовать другие материалы, такие как консерванты, красители, замутняющие средства и ароматизаторы. Материал для наполнения жидкостью содержит твердое лекарственное средство, которое было растворено, солюбилизировано или диспергировано (с помощью суспендирующих средств, таких как пчелиный воск, гидрогенизированное касторовое масло или полиэтиленгликоль 4000), или жидкое лекарственное средство в средах-носителях или комбинациях сред-носителей, таких как минеральное масло, растительные масла, триглицериды, гликоли, полиолы и поверхностно-активные средства.

Подходящие суточные дозы соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемой соли при осуществлении терапевтического лечения людей составляют приблизительно 0,0001-100 мг/кг веса тела. Предпочтительными являются составы для перорального введения, в частности таблетки или капсулы, которые могут быть составлены посредством способов, известных специалистам в данной области техники, с обеспечением доз активного соединения в диапазоне от 0,1 мг до 1000 мг.

[Примеры]

Настоящее изобретение конкретно описано принимая во внимание примеры, показанные ниже. Однако, настоящее изобретение ими не ограничено. Кроме того, они ни в коем случае не должны толковаться ограничивающим образом.

Примеры синтеза селективного ингибитора PARP1

Примеры 1-32 синтеза, описанные ниже, селективных ингибиторов PARP1 аналогичны описанным в примерах 1-32 в WO 2021/013735.

Общие экспериментальные условия

Спектры ^1H ЯМР получали с применением спектрометра Bruker при 300 МГц, 400 МГц или 500 МГц при 27°C, если не указано иное; химические сдвиги выражены в частях на миллион (ppm, δ -единицах) и относительно остаточного моно- ^1H изотополога растворителя (CHCl_3 : 7,24 ppm; CH_2Cl_2 : 5,32 ppm; $\text{CD}_3\text{S(=O)CD}_2\text{H}$: 2,49 ppm). Константы взаимодействия приведены в герцах (Гц). С помощью паттернов разделения описывают наблюдаемые мультиплетности и их обозначают как s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), m (мультиплет) и br s (широкий синглет). LC-MS осуществляли с применением системы Waters для UPLC, оснащенной масс-спектрометром Waters SQD, или системы Shimadzu LC-20AD LC-20XR LC-30AD с масс-спектрометром Shimadzu 2020. Указанные молекулярные ионы соответствуют $[\text{M}+\text{H}]^+$, если не указано иное; для молекул с дифрактограммами множественных изотопов (Br, Cl и т. д.) указанное значение является значением, полученным для изотопа с наименьшей массой, если не указано иное.

Флэш-хроматографию проводили с применением прямофазной флэш-хроматографии на системе для очистки SP1TM от BiotageTM, CombiFlash[®]Rf от ISCO или на системе Gilson от Thermo Fisher с применением картриджей с силикагелем для нормальной фазы FLASH⁺TM (40 M, 25 M или 12 M) или SNAPTM KP-Sil (340, 100, 50 или 10), колонок Flash silica-CS от Agela, с применением флэш-колонок C18 или стандартной флэш-хроматографии. В целом, все используемые растворители были коммерчески доступными и аналитической степени чистоты. В реакциях обычно применяли безводные растворители. Фазовые сепараторы, используемые в примерах, представляют собой колонки для фазового разделения ISOLUTE[®]. Промежуточные соединения и примеры, названные ниже, были названы с применением ACD/Name 12.01 от Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs). Исходные материалы получали из коммерческих источников или получали посредством путей, указанных в источниках литературы.

Анализ посредством порошковой рентгеновской дифракции (XRPD)

XRPD-анализ проводили с применением дифрактометра Bruker D8, который является коммерчески доступным от Bruker AXS Inc™ (Мэдисон, штат Висконсин, США). Спектры XRPD получали посредством установки образца (примерно 10 мг) материала для анализа на пластинчатый фиксатор из монокристалла кремния (например, кремниевый держатель образцов для рентгеновской дифракции с нулевым фоновым значением Bruker) и распределения образца в виде тонкого слоя с помощью предметного стекла. Образец вращали со скоростью 30 оборотов в минуту (для улучшения статистики подсчета) и облучали рентгеновским излучением, генерируемым медной длиной острофокусной трубкой, эксплуатируемой при 40 кВ и 40 мА с длиной волны 1,5406 ангстрема (т. е. приблизительно 1,54 ангстрема). Образец экспонировали в течение 1 секунды с приращением в 0,02 градуса угла 2-тета (режим непрерывного сканирования) в диапазоне от 5 градусов до 40 градусов угла 2-тета в режиме тета-тета. Время анализа составляло приблизительно 15 мин для D8.

Значения угла 2θ XRPD могут изменяться в приемлемом диапазоне, например, в диапазоне $\pm 0,2^\circ$, и такие значения интенсивности XRPD могут изменяться при измерении по сути той же кристаллической формы по целому ряду причин, в том числе, например, предпочтительной ориентации. Принципы XRPD описаны в публикациях, таких как, например, Giacovazzo, C. et al. (1995), *Fundamentals of Crystallography*, Oxford University Press; Jenkins, R. and Snyder, R. L. (1996), *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*, John Wiley & Sons, New York; and Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), *X-ray Diffraction Procedures*, John Wiley and Sons, New York.

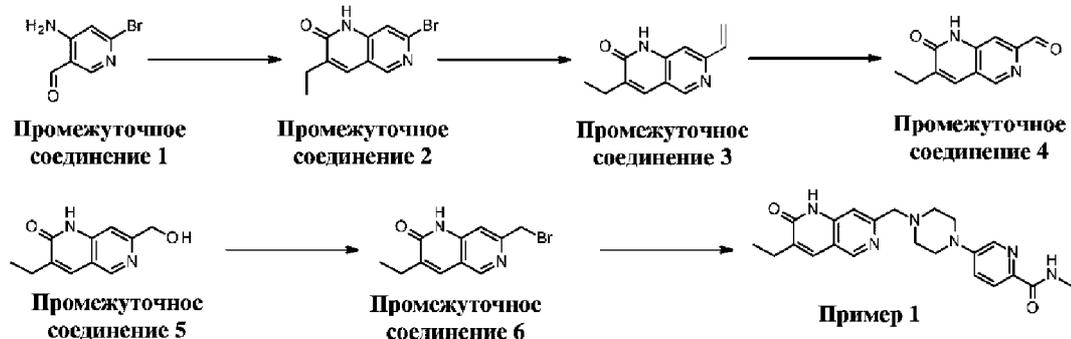
DSC-анализ

DSC-анализ проводили на образцах, полученных в соответствии со стандартными способами с применением DSC-калориметра Q SERIES™ Q1000, доступного от TA INSTRUMENTS® (Нью-Касл, штат Делавер, США). Образец (примерно 2 мг) взвешивали в алюминиевом тигле для образцов и переносили в DSC. Устройство продували азотом со скоростью 50 мл/мин и данные собирали в диапазоне от 22°C до 300°C с использованием скорости динамического нагревания 10°C/минута. Тепловые данные анализировали с применением стандартного программного обеспечения, например Universal, вер. 4.5A от TA INSTRUMENTS®.

Применяли следующие сокращения: AcOH=уксусная кислота; водн.=водный; BAST=трифторид бис(2-метоксиэтил)аминосеры; Coc_2O =ди-*трет*-бутилдекарбонат; Coc =трет-бутилоксикарбонил; CDCl_3 =дейтерированный хлороформ; CD_3OD =дейтерированный метанол; CH_3NO_2 =нитрометан; DCE=1,2-дихлорэтан; DCM=дихлорметан; DEA=диэтиламин; DEAD=диэтилазодикарбоксилат; перйодат Десса-Мартина=1,1,1-трис(ацетилокси)-1,1-дигидро-1,2-бензйодоксол-3-(1H)-он; DIPEA=N, N-диизопропилэтиламин; DMAP=2,6-диметиламинопиридин; DMF=N, N-диметилформамид; DMSO=диметилсульфоксид; DMSO-d_6 =дейтерированный диметилсульфоксид; DPPA=дифенилфосфоразидат; dppf=1,1'-

бис(дифенилфосфино)ферроцен; DIAD=диизопропил-(Е)-диазен-1,2-дикарбоксилат; DSC=дифференциальная сканирующая калориметрия; DTAD=ди-трет-бутил-(Е)-диазен-1,2-дикарбоксилат; ee=энантиомерный избыток; экв.=эквивалент; ESI=ионизация электрораспылением; Et₂O=диэтиловый эфир; EtOAc или EA=этилацетат; EtOH=этанол; FA=муравьиная кислота; катализатор Граббса (дихлорид 1,3-димеситилимидазолин-2-илиден)(трициклогексилфосфин)рутения; ч=час(-ы); HATU=гексафторфосфат (диметиламино)-N, N-диметил(3-оксидо-1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридинил)метанимина; HCl=хлористоводородная кислота; H₂O₂=пероксид водорода; HP=высокое давление; IPA=изопропиловый спирт; LC=жидкостная хроматография; LiClO₄=перхлорат лития; ммоль=миллимоль; mCPBA=мета-хлорпероксибензойная кислота; MeOH=метанол; мин=минута(-ы); MeCN или CH₃CN=ацетонитрил; MeNO₂=нитрометан; MS=масс-спектрометрия; NMP=N-метил-2-пирролидон; ЯМР=ядерный магнитный резонанс; Pd/C=палладий на угле; Pd₂dba₃=трис(добензилиденацетон)дипалладий (0); PdCl₂(dppf)=дихлорид 1,1'-бис(ди-трет-бутилфосфино)ферроценпалладия; PE=петролейный эфир; PPh₃=трифенилфосфин; к. т.=комнатная температура; Rt или RT=время удерживания; Ruphos Pd G3=метансульфонат (2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропокси-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия (II); насыщ.=насыщенный; SFC=сверхкритическая жидкостная хроматография; ТЗР=2,4,6-трипропил-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфинан-2,4,6-триоксид; TBTU=тетрафторборат 2-(1H-бензо[d][1,2,3]триазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилизуория; TFA=трифторуксусная кислота; THF=тетрагидрофуран; TLC=тонкослойная хроматография; TMS=триметилсилил; Xantphos=4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен; CBr₄=тетрабромид углерода; HCl=хлористоводородная кислота; HBr=бромистоводородная кислота; Cs₂CO₃=карбонат цезия; MgSO₄=сульфат магния; NaHCO₃=бикарбонат натрия; DDQ=2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон; SOCl₂=тионилхлорид; DIBAL-H=гидрид диизобутилалюминия; NH₄HCO₃=бикарбонат аммония; BINAP=2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил.

Синтез исходных веществ и промежуточных соединений



Промежуточное соединение 2. 7-Бром-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-он

Бутирилхлорид (0,143 мл, 1,37 ммоль) по каплям добавляли к перемешиваемому раствору 4-амино-6-бром-пиридин-3-карбальдегида (промежуточное соединение 1, 250

мг, 1,24 ммоль), DIPEA (1,086 мл, 6,22 ммоль) и DMAP (30,4 мг, 0,25 ммоль) в CH_2Cl_2 (5 мл) при 0°C . Полученный раствор перемешивали при к. т. в течение 4 ч. Добавляли дополнительные 2 экв. бутирилхлорида и продолжали осуществление реакции в течение еще 24 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта. Добавляли 1,5 мл MeOH и твердое вещество (продукт) отфильтровывали, промывали с помощью 1 мл MeOH с получением 7-бром-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 2**, 167 мг, 53,1%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (DMSO- d_6) 1,17 (3H, t), 2,45-2,50 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 7,35 (1H, s), 7,82 (1H, s), 8,63 (1H, s), 12,09 (1H, br s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=252$.

Промежуточное соединение 3. 3-Этил-7-винил-1H-1,6-нафтиридин-2-он

$\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (37,6 мг, 0,05 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси 7-бром-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 2**, 130 мг, 0,51 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (0,105 мл, 0,62 ммоль) и K_2CO_3 (213 мг, 1,54 ммоль) в 1,4-диоксане (4 мл)/воде (1,333 мл) и полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органические слои объединяли, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-20% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением 3-этил-7-винил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 3**, 93 мг, 90%) в виде желтого твердого вещества.

^1H ЯМР (DMSO- d_6) 1,18 (3H, t), 2,53 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 5,49 (1H, dd), 6,27 (1H, dd), 6,84 (1H, dd), 7,15 (1H, s), 7,81 (1H, s), 8,78 (1H, s), 12,00 (1H, br s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=201$.

Промежуточное соединение 4. 3-Этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-карбальдегид

Тетраоксид осмия в H_2O (0,024 мл, 3,00 мкмоль) добавляли к раствору 3-этил-7-винил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 3**, 30 мг, 0,15 ммоль), 2,6-лутидина (0,035 мл, 0,30 ммоль) и перйодата натрия (128 мг, 0,60 ммоль) в THF (1 мл)/воде (0,200 мл) и перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом, и фильтрат концентрировали до сухого состояния. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-15% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-карбальдегида (**промежуточное соединение 4**, 24,00 мг, 79%) в виде светло-желтой пены.

¹H ЯМР (DMSO-d₆) 1,20 (3H, t), 2,55-2,62 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 7,73 (1H, s), 7,95 (1H, s), 9,03 (1H, s), 10,00 (1H, s), 12,32 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=203.

Промежуточное соединение 5. 3-Этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,6-нафтиридин-2-он

Борогидрид натрия (61,4 мг, 1,62 ммоль) медленно добавляли к перемешиваемому раствору 3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-карбальдегида (**промежуточное соединение 4**, 82 мг, 0,41 ммоль) в метаноле (2 мл) при 0°C и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Метанол удаляли под вакуумом и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-35% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 5**, 68,0 мг, 82%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

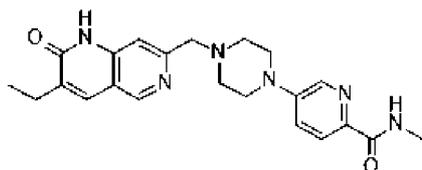
¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,18 (3H, t), 2,52-2,55 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 4,59 (2H, br s), 5,52 (1H, br s), 7,33 (1H, s), 7,80 (1H, s), 8,71 (1H, s), 12,01 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=205.

Промежуточное соединение 6. 7-(Бромметил)-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-он

СBr₄ (928 мг, 2,80 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 5**, 381 мг, 1,87 ммоль) и трифенилфосфина (734 мг, 2,80 ммоль) в CH₂Cl₂ (18,656 мл) при 0°C и полученный раствор перемешивали при 0°C в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-15% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 6**, 386 мг, 77%) в виде белого твердого вещества (содержит оксид трифенилфосфина, вызывает сложности при разделении). Данное соединение применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=267.

Пример 1 синтеза. 5-[4-[(3-Этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-тиридин-2-карбоксамид

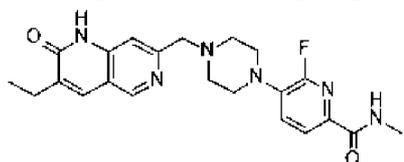


DIPEA (0,059 мл, 0,34 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 6**, 30 мг, 0,11 ммоль) и N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 13**, 42,8 мг, 0,15 ммоль) в ацетонитриле (1 мл) при 20°C.

Полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом и полученный неочищенный материал дополнительно очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии (RediSep Rf Gold® C18, 0-90% ацетонитрила в воде, 0,1% NH₄OH в качестве добавки). Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением 5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамида (**пример 1 синтеза**, 23,60 мг, 51,7%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,18 (3H, br t), 2,54 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 2,67 (4H, br s), 2,79 (3H, br d), 3,38 (4H, br s), 3,75 (2H, br s), 7,34 (1H, s), 7,42 (1H, br dd), 7,77-7,88 (2H, m), 8,29 (1H, br d), 8,40 (1H, br d), 8,75 (1H, s), 11,60-12,11 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=407.

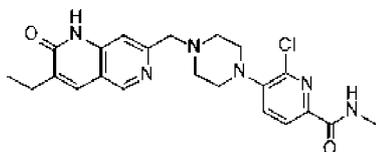
Пример 2 синтеза. 5-[4-[(3-Этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метил-пиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,082 мл, 0,47 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 6**, 25 мг, 0,09 ммоль) и 6-фтор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, HCl (**промежуточное соединение 23**, 28,3 мг, 0,10 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-20% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамида (**пример 2 синтеза**, 17,00 мг, 42,8%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,18 (3H, t), 2,52-2,55 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 2,64 (4H, br s), 2,77 (3H, d), 3,20 (4H, br s), 3,70 (2H, s), 7,32 (1H, s), 7,59 (1H, dd), 7,80 (1H, s), 7,86 (1H, d), 8,31-8,49 (1H, m), 8,73 (1H, s), 11,93 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=425.

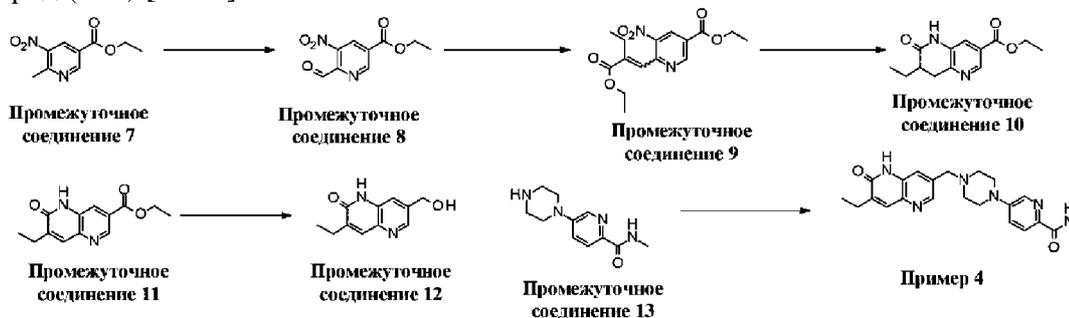
Пример 3 синтеза. 6-Хлор-5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,082 мл, 0,47 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-

(бромметил)-3-этил-1H-1,6-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 6**, 25 мг, 0,09 ммоль) и 6-хлор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 47**, 33,7 мг, 0,10 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C и полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-20% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 6-хлор-5-[4-[(3-этил-2-оксо-1H-1,6-нафтиридин-7-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 3 синтеза**, 19,20 мг, 46,5%) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,18 (3H, t), 2,53 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 2,66 (4H, br s), 2,80 (3H, d), 3,15 (4H, br s), 3,72 (2H, s), 7,33 (1H, s), 7,68 (1H, d), 7,81 (1H, s), 7,95 (1H, d), 8,43 (1H, br d), 8,74 (1H, s), 11,93 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=441.



Промежуточное соединение 8. Этил-6-формил-5-нитропиридин-3-карбоксилат

Смесь этил-6-метил-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 7**, 10 г, 47,58 ммоль) и диоксида селена (7,92 г, 71,36 ммоль) в 1,4-диоксане (50 мл) перемешивали при 110°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через подушку из целита и целит промывали этилацетатом. Объединенный фильтрат концентрировали и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-70% этилацетата в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением этил-6-формил-5-нитро-пиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 8**, 9,70 г, 91%) в виде коричневого масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,48 (3H, t), 4,54 (2H, q), 8,81 (1H, d), 9,51 (1H, d), 10,32 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=224.

Промежуточное соединение 9. Этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилат (смесь изомеров E/Z)

К перемешиваемому раствору гидроксида натрия (9,63 г, 240,89 ммоль) (60% в минеральном масле) в безводном THF (100 мл) с помощью капельной воронки добавляли этил-2-(диэтоксифосфорил)бутаноат (60,8 г, 240,89 ммоль) при 0°C с получением смеси, окрашенной в серый цвет. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин, и нагревали до комнатной температуры в течение 10 минут, и

перемешивали при 40°C в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали до -78°C и затем к данной охлажденной реакционной смеси медленно добавляли раствор этил-6-формил-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 8**, 22,5 г, 100,37 ммоль) в 100 мл THF. Смесь гасили насыщ. раствором NH₄Cl, экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-50% этилацетата в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 9**, 24,30 г, 75%) в виде желтого масла (1:1 и смесь изомеров E/Z). 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,13 (3H, t), 1,18 (3H, t), 1,23 (3H, t), 1,37 (3H, t), 1,45 (6H, q), 2,57 (2H, qd), 2,66 (2H, q), 4,11-4,24 (2H, m), 4,32 (2H, q), 4,45-4,56 (4H, m), 7,08 (1H, s), 7,85 (1H, s), 8,86 (2H, dd), 9,26 (1H, d), 9,43 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=322.

Промежуточное соединение 10. Этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат

Смесь этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилата (1:1 смеси изомеров E/Z) (**промежуточное соединение 9**, 3,75 г, 11,63 ммоль), Pd/C (1,857 г, 1,75 ммоль) (10%) в этаноле (30 мл) дегазировали, заполняли с помощью H₂ (из баллона) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в атмосфере H₂. Смесь фильтровали через слой целита и слой целита промывали этанолом. После концентрирования 4 M HCl в диоксанах (15 мл) добавляли к полученному остатку и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь разбавляли эфиром и твердое вещество отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и высушивали под вакуумом с получением этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 10**, 2,260 г, 78%) в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 0,94 (3H, t), 1,33 (3H, t), 1,41-1,51 (1H, m), 1,69-1,81 (1H, m), 2,41-2,48 (1H, m), 2,94 (1H, dd), 3,20 (1H, dd), 4,35 (2H, t), 7,67 (1H, d), 8,61 (1H, d), 10,32 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=249.

Промежуточное соединение 11. Этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат

Этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат (**промежуточное соединение 10**, 2,26 г, 9,10 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (40 мл), добавляли DDQ (2,273 г, 10,01 ммоль) и смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 3 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, добавляли насыщ. раствор NaHCO₃ и остаток перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Твердое вещество отфильтровывали, промывали водой, затем промывали с помощью 10 мл диэтилового эфира. Полученное твердое вещество высушивали под вакуумом с получением этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 11**, 1,738 г, 78%) в виде светло-коричневого

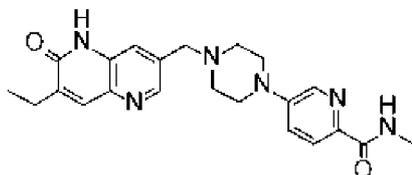
твёрдого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,14-1,28 (3H, m), 1,35 (3H, t), 2,58 (2H, q), 4,38 (2H, q), 7,83 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,90 (1H, s), 12,05 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=247.

Промежуточное соединение 12. 3-Этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,5-нафтиридин-2-он

Алюмогидрид лития, 2 М в THF (29,2 мл, 58,47 ммоль) по каплям добавляли к этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилату (**промежуточное соединение 11**, 7,2 г, 29,24 ммоль) в тетрагидрофуране (150 мл) при 0°C в течение 45 минут в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 часа. Реакционную смесь гасили посредством добавления по каплям 1 М водн. HCl (29 мл). Реакционную смесь концентрировали и твёрдое вещество разбавляли водой (~150 мл) и 29 мл 1М раствора HCl с получением желтой суспензии. Твёрдое вещество собирали посредством фильтрации, промывали водой, диэтиловым эфиром и высушивали с получением неочищенного продукта в виде желтого твёрдого вещества (загрязненного некоторым количеством неорганической соли). Данное твёрдое вещество суспендировали в смеси метанола и DCM (2:1) (400 мл) и нагревали с обратным холодильником. Твёрдое вещество отфильтровывали. Данное твёрдое вещество ресуспендировали в смеси метанол/DCM и повторяли данную процедуру 5 раз с получением большей части продукта из данной смеси. Затем объединенный фильтрат концентрировали до приблизительно 100 мл и твёрдое вещество собирали посредством фильтрации, промывали эфиром, высушивали под вакуумом с получением 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 12**, 4,35 г, 72,8%) в виде желтого твёрдого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,18 (3H, t), 2,52-2,56 (2H, m), 4,61 (2H, d), 5,44 (1H, t), 7,61 (1H, s), 7,74 (1H, s), 8,37 (1H, s), 11,87 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=205,3.

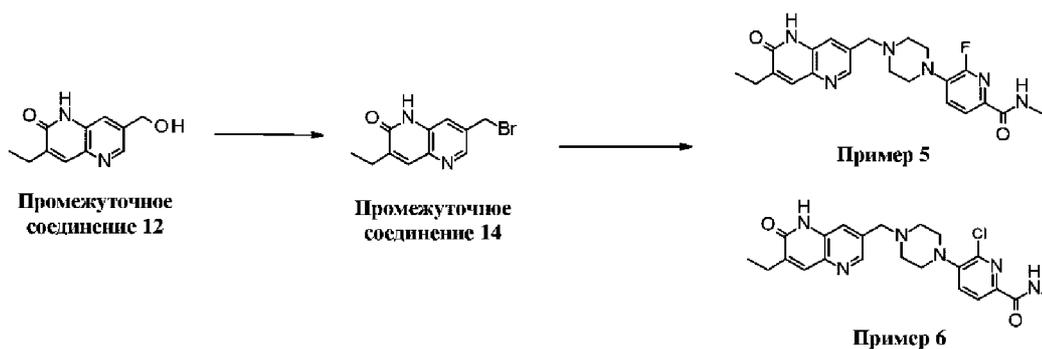
Пример 4 синтеза. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



Тионилхлорид (6,41 мл, 88,14 ммоль) по каплям добавляли к суспензии 3-этил-7-(гидроксиметил)-1,5-нафтиридин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 12**, 3 г, 14,69 ммоль) и N, N-диметилформамида (0,114 мл, 1,47 ммоль) в CH₂Cl₂ (60 мл) при 0°C и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Смесь концентрировали до сухого состояния с получением неочищенного 7-(хлорметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 17**).

DIPEA (12,83 мл, 73,45 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-

(хлорметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 17**, неочищенное, выше), йодида калия (0,488 г, 2,94 ммоль) и N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксиамида, 2HCl (**промежуточное соединение 13**, 4,31 г, 14,69 ммоль) в ацетонитриле (50,00 мл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Неочищенный материал разбавляли водой, подщелачивали водн. раствором NaHCO₃ и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-15% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксиамида (**пример 4 синтеза**, 3,93 г, 65,8%) в виде грязно-белого частично кристаллического твердого вещества. 1H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,19 (3H, t), 2,53-2,59 (6H, m), 2,79 (3H, d), 3,33-3,39 (4H, m), 3,66 (2H, s), 7,39 (1H, dd), 7,64 (1H, s), 7,76 (1H, s), 7,83 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,36-8,40 (1H, m), 8,41 (1H, d), 11,85 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=406.

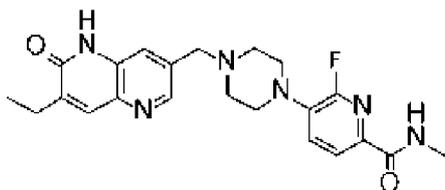


Промежуточное соединение 14. 7-(Бромметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-он

СВг4 (219 мг, 0,66 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 12**, 90 мг, 0,44 ммоль) и трифенилфосфина (173 мг, 0,66 ммоль) в CH₂Cl₂ (4 мл) при 0°C. Полученный раствор перемешивали при 0°C в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-15% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 14**, 84 мг, 71,4%) (содержит оксид трифенилфосфина, вызывает сложности при разделении). Данное соединение применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

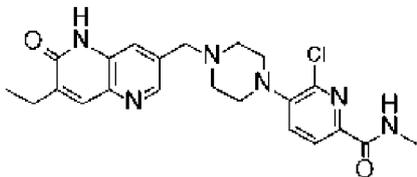
Масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=267.

Пример 5 синтеза. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилтиридин-2-карбоксиамид

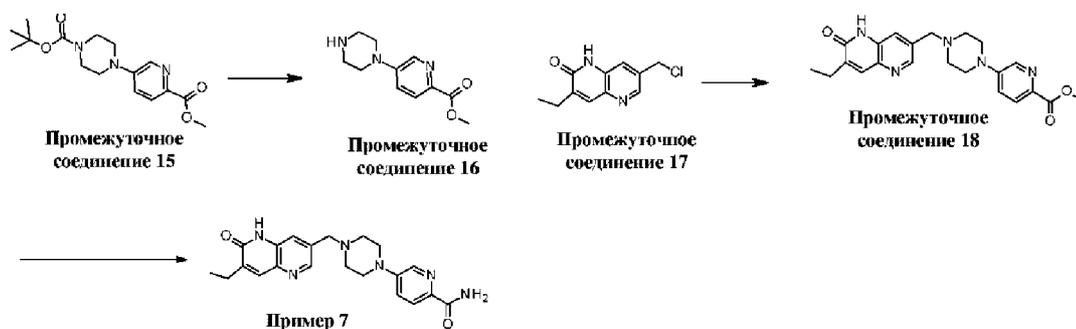


DIPEA (0,082 мл, 0,47 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 14**, 25 мг, 0,09 ммоль) и 6-фтор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 23**, 32,0 мг, 0,10 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-20% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 5 синтеза**, 13,00 мг, 33%), бледно-желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500МГц, DMSO-d6) 1,19 (3H, t), 2,55 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 2,58 (4H, br d), 2,77 (3H, d), 3,19 (4H, br s), 3,67 (2H, s), 7,57 (1H, dd), 7,63 (1H, s), 7,76 (1H, s), 7,85 (1H, d), 8,32-8,49 (2H, m), 11,85 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=425.

Пример 6 синтеза. 6-Хлор-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,082 мл, 0,47 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточное соединение 14**, 25 мг, 0,09 ммоль) и 6-хлор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид (**промежуточное соединение 48**, 26,2 мг, 0,10 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-20% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 6-хлор-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**примера 6 синтеза**, 19,80 мг, 48,0%) в виде бледно-желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500МГц, DMSO-d6) 1,19 (3H, t), 2,55 (2H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 2,58-2,65 (4H, m), 2,79 (3H, d), 3,13 (4H, br s), 3,68 (2H, s), 7,63 (1H, d), 7,67 (1H, d), 7,76 (1H, s), 7,94 (1H, d), 8,34-8,50 (2H, m), 11,85 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=441.



Промежуточное соединение 16. Метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксилат

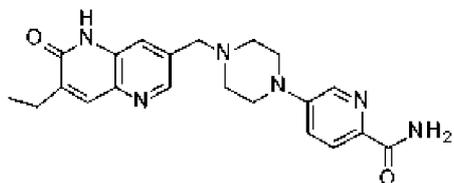
НCl в диоксане (4,67 мл, 18,67 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору трет-бутил-4-(6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилата (промежуточное соединение 15, 600 мг, 1,87 ммоль) в MeOH (1 мл) и полученный раствор перемешивали при к. т. в течение 18 часов. Растворитель удаляли под вакуумом с получением метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксилата, 2HCl (промежуточное соединение 16, 543 мг, 99%) в виде светло-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 3,20 (4H, br s), 3,71 (4H, br s), 3,85 (3H, s), 7,58 (1H, br d), 7,99 (1H, br d), 8,43 (1H, br s), 9,73 (2H, br), 11,29-11,75 (1H, br); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=222.

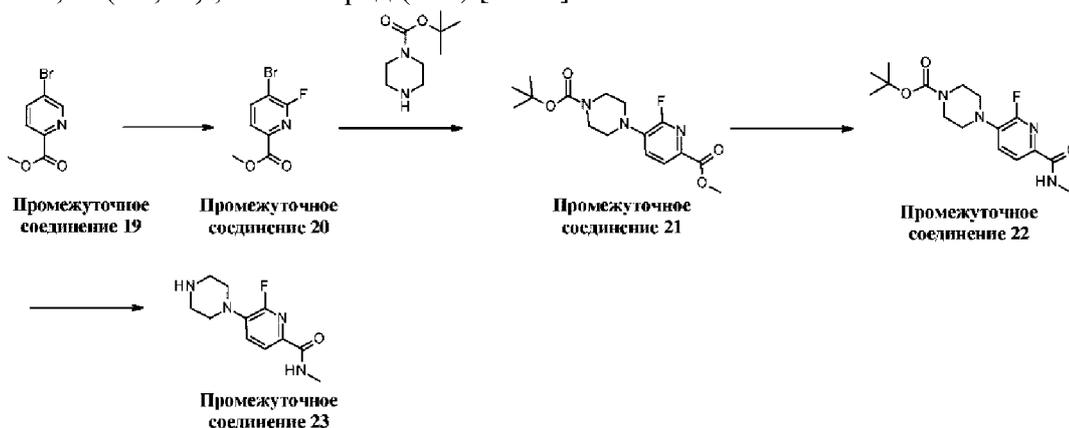
Промежуточное соединение 18. Метил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксилат

DIPEA (944 мкл, 5,40 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(хлорметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она, HCl (промежуточное соединение 17, 200 мг, 0,77 ммоль), йодида натрия (11,57 мг, 0,08 ммоль) и метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксилата, 2HCl (промежуточное соединение 16, 250 мг, 0,85 ммоль) в ацетонитриле (6774 мкл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, добавляли 0,4 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1,5 мл ацетонитрила и реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин. Твердое вещество отфильтровывали, промывали с помощью 2 мл воды, затем промывали с помощью 1 мл ацетонитрила с получением метил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксилата (промежуточное соединение 18, 158 мг, 50,2%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,19 (3H, br t), 2,54-2,61 (6H, m), 3,40 (4H, br s), 3,66 (2H, s), 3,81 (3H, s), 7,35 (1H, br dd), 7,62 (1H, s), 7,75 (1H, s), 7,88 (1H, br d), 8,28-8,47 (2H, m), 12,03 (1H, br); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=408.

Пример 7 синтеза. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]тиридин-2-карбоксамида



Аммиак в метаноле (4 мл, 28,00 ммоль) добавляли к метил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксилату (**промежуточное соединение 18**, 60 мг, 0,15 ммоль) и полученный раствор нагревали до 50°C в течение 24 ч (в герметично закрытой пробирке). Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и твердое вещество отфильтровывали и промывали с помощью 2 мл метанола с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида (**пример 7 синтеза**, 88 мг, 90%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,19 (3H, t), 2,56 (6H, m, перекрывается с пиком растворителя DMSO), 3,35 (4H, br d), 3,66 (2H, s), 7,30 (1H, br s), 7,40 (1H, dd), 7,64 (1H, s), 7,76 (2H, s), 7,85 (1H, d), 8,28 (1H, d), 8,41 (1H, d), 11,61-11,98 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=393.



Промежуточное соединение 20. Метил-5-бром-6-фтор-пиридин-2-карбоксилат

В высушенную в печи колбу загружали метил-5-бромпиридин-2-карбоксилат (**промежуточное соединение 19**, 6 г, 27,77 ммоль) в ацетонитриле (60 мл). Добавляли фторид серебра (II) (14,18 г, 97,21 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через фильтровальную бумагу и промывали с помощью DCM. Фильтрат концентрировали с получением светло-коричневого твердого вещества. Остаток суспендировали в смеси DCM и насыщ. раствора NH₄Cl и белую суспензию отфильтровывали. Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали с помощью DCM (100 мл x 2). Объединенные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-25% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением метил-5-бром-6-фторпиридин-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 20**, 5,98 г, выход 90%). ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 4,01 (3H, s), 7,93 (1H, d), 8,15 (1H, t); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=234.

Промежуточное соединение 21. трет-Бутил-4-(2-фтор-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат

Смесь трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (13,11 г, 70,41 ммоль), метил-5-бром-6-фторпиридин-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 20**, 10,985 г, 46,94

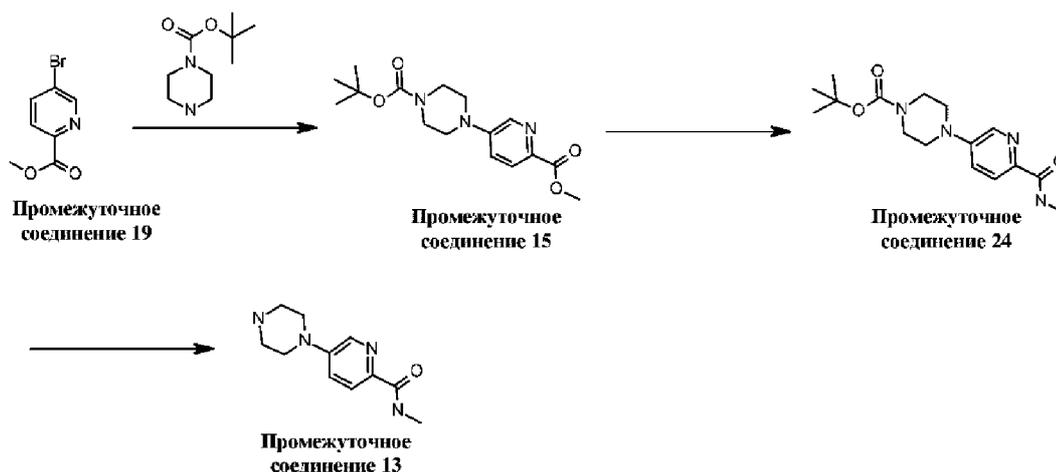
ммоль), RuphosPd-G3 (2,5 г, 2,99 ммоль) и Cs₂CO₃ (38 г, 116,63 ммоль) в 1,4-диоксане (200 мл) перемешивали при 80°C в течение ночи в атмосфере N₂. Смесь разбавляли водой и этилацетатом, слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM (100 мл x 2). Объединенные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-100% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-(2-фтор-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 21**, 14,00 г, 88%) в виде желтого твердого вещества; ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,51 (9H, s), 3,16-3,32 (4H, m), 3,58-3,72 (4H, m), 3,98 (3H, s), 7,29-7,34 (1H, m), 8,00 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=340.

Промежуточное соединение 22. трет-Бутил-4-[2-фтор-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

трет-Бутил-4-(2-фтор-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 21**, 12,49 г, 36,80 ммоль) в метиламине (120 мл, 36,80 ммоль, 33 вес. % в этаноле) перемешивали при к. т. в течение 24 ч (в герметично закрытой пробирке). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в DCM, и фильтровали через слой силикагеля, и промывали этилацетатом. Фильтрат концентрировали и высушивали под вакуумом с получением трет-бутил-4-[2-фтор-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 22**, 12,45 г, 100%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,42 (9H, s), 2,77 (3H, d), 3,04-3,16 (4H, m), 3,43-3,56 (4H, m), 7,59 (1H, dd), 7,80-7,93 (1H, m), 8,41 (1H, q); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=340.

Промежуточное соединение 23. 6-Фтор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид

HCl (4 M в диоксане, 100 мл, 400,00 ммоль) добавляли к раствору трет-бутил-4-[2-фтор-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 22**, 12,5 г, 36,94 ммоль) в 1,4-диоксане (50 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, в течение которых температуру повышали до комнатной температуры, с получением желтой суспензии. Суспензию разбавляли эфиром, твердое вещество отфильтровывали и промывали эфиром. Данное твердое вещество высушивали под вакуумом с получением 6-фтор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 23**, 11,42 г, 99%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,8 (d, J=4,6 Гц, 3 H) 3,3 (br s, 4 H) 3,4 (br d, J=4,4 Гц, 4 H) 7,6-7,7 (m, 1 H) 7,9 (d, J=8,1 Гц, 1 H) 8,4 (br d, J=4,4 Гц, 1 H) 9,0-9,3 (m, 2 H); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=239



Промежуточное соединение 15. трет-Бутил-4-(6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат

Ruphos Pd G3 (4,07 г, 4,86 ммоль) добавляли к дегазированной смеси метил-5-бромпиридин-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 19**, 30 г, 138,87 ммоль), трет-бутил-пиперазин-1-карбоксилата (27,2 г, 145,81 ммоль), Cs₂CO₃ (90 г, 277,73 ммоль) в 1,4-диоксане (200 мл) и смесь перемешивали при 110°C в течение 6 ч в атмосфере N₂. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом (150 мл x 3). Объединенные органические слои высушивали над безводным Na₂SO₄ и фильтровали. К данному фильтрату добавляли функционализированный 3-(диэтилентриамино)пропил силикагель (12 г, загрузка 1,3 ммоль/г) и смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали до ~100 мл. Желтое кристаллическое твердое вещество отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали под вакуумом с получением трет-бутил-4-(6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 15**, 26,36 г, 82 ммоль, 59,1%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,50 (9H, s), 3,31-3,42 (4H, m), 3,56-3,68 (4H, m), 3,98 (3H, s), 8,04 (1H, d), 8,37 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=322.

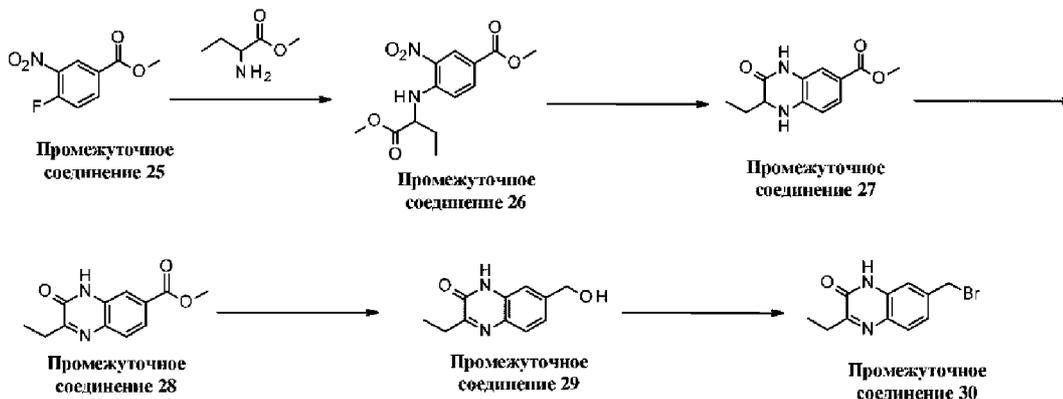
Промежуточное соединение 24. трет-Бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

Метиламин (100 мл, 1155,26 ммоль, 40% в воде) добавляли к раствору трет-бутил-4-(6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 15**, 36 г, 112,02 ммоль) в MeOH (100 мл), и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч с получением белой суспензии. Смесь концентрировали, остаток разделяли между насыщ. раствором NH₄Cl и DCM, слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM, органические слои объединяли, промывали солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 24**, 35,9 г, 100%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,49 (9H, s), 3,02

(3H, d), 3,26-3,35 (4H, m), 3,58-3,67 (4H, m), 7,23 (1H, dd), 7,81 (1H, br d), 8,07 (1H, d), 8,16 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=321$.

Промежуточное соединение 13. Карбоксилат N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид

HCl (4 M в диоксане, 150 мл, 600,00 ммоль) добавляли к суспензии трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 24**, 35,9 г, 112,05 ммоль) в MeOH (50 мл) и полученную оранжевую суспензию перемешивали при к. т. в течение 4 ч. Приблизительно 80 мл растворителя удаляли при пониженном давлении и смесь разбавляли эфиром и гексанами (200 мл, 1/1). Твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали гексанами, высушивали и высушивали под вакуумом с получением N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, соли 2HCl (**промежуточное соединение 13**, 37,0 г, 100%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 2,79 (3H, d), 3,22 (4H, br s), 3,53-3,67 (4H, m), 7,51 (1H, dd), 7,91 (1H, d), 8,33 (1H, d), 8,50 (1H, br s), 9,19-9,49 (2H, m); масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=221$



Промежуточное соединение 26. Метил-4-(1-метоксикарбонилпропиламино)-3-нитробензоат

Гидрокарбонат натрия (27,0 г, 321,39 ммоль) частями добавляли к перемешиваемой смеси метил-4-фтор-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 25**, 16 г, 80,35 ммоль), и метил-2-аминобутаноата, HCl (14,81 г, 96,42 ммоль) в THF (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь гасили посредством добавления воды, экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой промывали насыщенным водн. раствором NaHCO₃, органический слой высушивали над MgSO₄ и концентрировали до сухого состояния с получением метил-4-(1-метоксикарбонилпропиламино)-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 26**, 22,86 г, 96%) в виде ярко-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 0,91 (3H, t), 1,75-2,12 (2H, m), 3,75 (3H, s), 3,85 (3H, s), 4,63-4,82 (1H, m), 7,15 (1H, d), 8,00 (1H, dd), 8,52-8,76 (2H, m).

Промежуточное соединение 27. Метил-2-этил-3-оксо-2,4-дигидро-1H-хиноксалин-6-карбоксилат

Pd/C (4,15 г, 3,90 ммоль) частями добавляли к перемешиваемому раствору

метил-4-(1-метоксикарбонилпропиламино)-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 26**, 23,1 г, 77,97 ммоль) в MeOH (300 мл) и полученную взвесь перемешивали в атмосфере H₂ при комнатной температуре в течение 30 ч. Метанол удаляли под вакуумом, добавляли 150 мл DMF и смесь перемешивали в течение 10 мин. Палладиевый катализатор отфильтровывали на целите, промывали с помощью 50 мл DMF (материал обладает очень низкой растворимостью в органических растворителях, таких как MeOH/DCM/EtOAc). Фильтрат концентрировали в Genevac с получением метил-2-этил-3-оксо-2,4-дигидро-1H-хиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 27**, 15,80 г, 87%) в виде серого твердого вещества. Материал анализировали посредством ЯМР и применяли на следующей стадии без очистки. 1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 0,91 (3H, t), 1,63-1,73 (2H, m), 3,75 (3H, s), 3,90 (1H, td), 6,71 (1H, d), 6,84 (1H, s), 7,33 (1H, d), 7,41 (1H, dd), 10,39 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=235.

Промежуточное соединение 28. Метил-2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-карбоксилат

DDQ (15,87 г, 69,92 ммоль) добавляли к суспензии метил-2-этил-3-оксо-2,4-дигидро-1H-хиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 27**, 15,6 г, 66,59 ммоль) в 1,4-диоксане (150 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь медленно добавляли к насыщенному водн. раствору NaHCO₃ (~500 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Осадок фильтровали, промывали водой (100 мл) и высушивали с получением метил-2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-карбоксилата в виде грязно-белого твердого вещества (**промежуточное соединение 28**, 11,40 г, 73,7%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,23 (3H, t), 2,83 (2H, q), 3,89 (3H, s), 7,73-7,86 (2H, m), 7,89 (1H, d), 12,45 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=233.

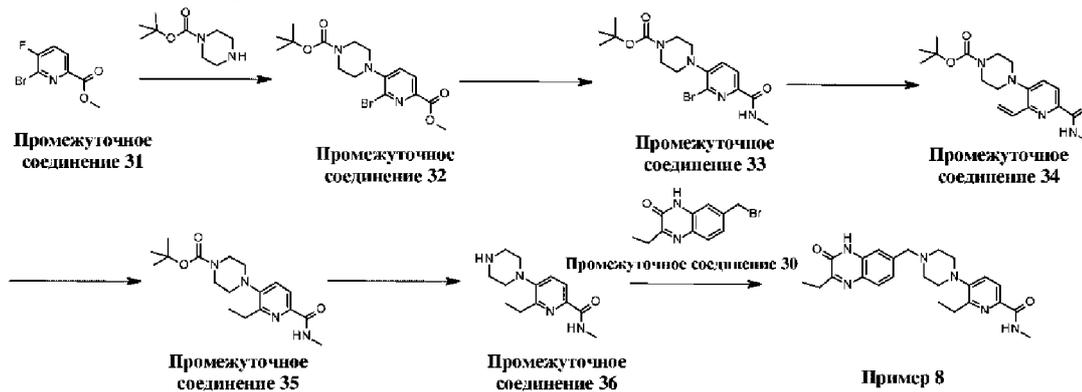
Промежуточное соединение 29. 3-Этил-7-(гидроксиметил)-1H-хиноксалин-2-он

Алюмогидрид лития, 2 M в THF (49,1 мл, 98,17 ммоль) по каплям добавляли к взвеси метил-2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 28**, 11,4 г, 49,09 ммоль) в тетрагидрофуране (350 мл) при 0°C в течение периода, составляющего 50 минут, в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 часа. Реакционную смесь медленно выливали в 1 M водн. HCl (300 мл) при 0°C. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (~300 мл x 2), затем экстрагировали с помощью смеси DCM/метанол (5:1) (150 мл x 3). Объединенные органические слои концентрировали до 300 мл и разбавляли эфиром (200 мл) с получением суспензии. Твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали эфиром, высушивали под вакуумом с получением 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-хиноксалин-2-она (**промежуточное соединение 29**, 8,00 г, 80%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,22 (3H, t), 2,80 (2H, q), 4,59 (2H, s), 5,19-5,61 (1H, m), 7,19 (1H, dd), 7,28 (1H, s), 7,66 (1H, d), 12,28 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=205.

Промежуточное соединение 30. 7-(Бромметил)-3-этил-1H-хиноксалин-2-он

Бромоводород (60 мл, 48 вес. % в воде) добавляли к 3-этил-7-(гидроксиметил)-

1H-хиноксалин-2-ону (**промежуточное соединение 29**, 7,8 г, 38,19 ммоль) (с получением прозрачного коричневого раствора) и смесь перемешивали при 80°C в течение 8 ч, реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали в 150 мл ледяной воды с получением грязно-белого осадка. Твердое вещество фильтровали под вакуумом, и промывали водой и затем диэтиловым эфиром, и высушивали с получением 7-(бромметил)-3-этил-1H-хиноксалин-2-она в виде бежевого твердого вещества (**промежуточное соединение 30**, 11,10 г, 84%) с 80% чистотой. 1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d6) 1,20 (3H, t), 2,79 (2H, q), 4,79 (2H, s), 7,27-7,38 (2H, m), 7,69 (1H, d), 12,34 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=267,0.



Промежуточное соединение 32. трет-Бутил-4-(2-бром-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат

Смесь трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 31**, 2,57 г, 13,80 ммоль), метил-6-бром-5-фторпиридин-2-карбоксилата (1,9 г, 8,12 ммоль) и карбоната калия (1,459 г, 10,55 ммоль) в DMF (20 мл) перемешивали при 110°C в течение 5 часов, результат LCMS указывал на полное превращение. Смесь охлаждали до к. т., разбавляли с помощью DCM и воды, слои разделяли. Водный слой дважды экстрагировали с помощью DCM и объединенные органические слои высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-50% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-(2-бром-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 32**, 2,200 г, 67,7%) в виде светло-желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,50 (9H, s), 3,05-3,20 (4H, m), 3,58-3,72 (4H, m), 3,98 (3H, s), 7,31 (1H, d), 8,06 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=400.

Промежуточное соединение 33. трет-Бутил-4-[2-бром-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

В герметично закрытый сосуд для работы под давлением загружали трет-бутил-4-(2-бром-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 32**, 2,2 г, 5,50 ммоль) и метиламин (22 мл, 176,72 ммоль) (33 вес. % в этаноле) и смесь нагревали до 60°C в течение 2 часов, результат LCMS указывал на

полное превращение. Смесь концентрировали и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-80% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[2-бром-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 33**, 2,200 г, 100%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,50 (9H, s), 3,02 (3H, d), 3,05-3,14 (4H, m), 3,56-3,74 (4H, m), 7,36 (1H, d), 7,68 (1H, br d), 8,11 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=399.

Промежуточное соединение 34. трет-Бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-винил-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

Смесь трет-бутил-4-[2-бром-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 33**, 200 мг, 0,50 ммоль), трибутил(винил)станнана (0,161 мл, 0,55 ммоль) и цикла XPhos Pd 2-го поколения (19,71 мг, 0,03 ммоль) в 1,4-диоксане (5 мл) перемешивали при 100°C в атмосфере N₂ в течение 2,5 ч., результат LCMS указывал на полное превращение. Смесь разбавляли с помощью DCM, промывали насыщ. NH₄Cl, органический слой высушивали (безводный Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-80% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-винил-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 34**, 174 мг, 100%) в виде белого твердого вещества. Масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=347

Промежуточное соединение 35. трет-Бутил-4-[2-этил-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

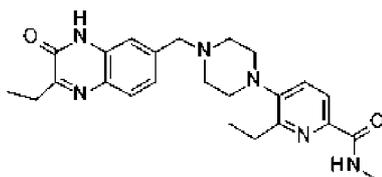
Pd/C (53,5 мг, 0,05 ммоль) (10 вес. % в пересчете на сухое вещество, влажный при загрузке) добавляли к раствору трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-винил-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 34**, 174 мг, 0,50 ммоль) MeOH (6 мл). Колбу дегазировали и повторно заполняли H₂ (из баллона). Смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. Результат LCMS указывал на отсутствие завершения реакции. Добавляли дополнительное количество Pd/C (53,5 мг, 0,05 ммоль) и полученную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 ч в атмосфере H₂. Смесь фильтровали через подушку из целита, промывали метанолом, фильтрат концентрировали до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[2-этил-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 35**, 172 мг, 98%) в виде бесцветного остатка. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,37 (3H, t), 1,51 (9H, s), 2,82-2,95 (6H, m), 3,05 (3H, d), 3,57-3,73 (4H, m), 7,39 (1H, d), 7,93-8,13 (2H, m); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=348.

Промежуточное соединение 36. 6-Этил-N-метил-5-пиперазин-1-илтиридин-2-карбоксамид

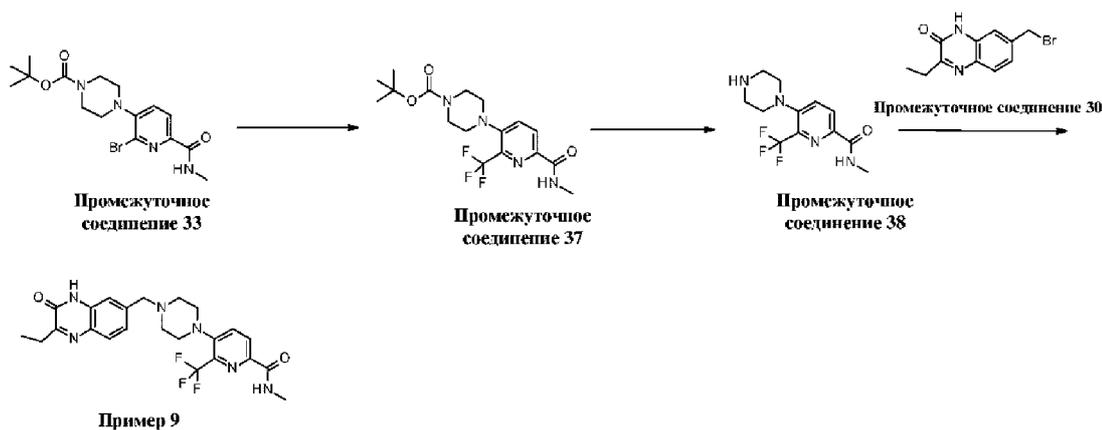
Смесь трет-бутил-4-[2-этил-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-

карбоксилата (**промежуточное соединение 35**, 172 мг, 0,49 ммоль) в HCl (4 М в диоксане, 8 мл, 32,00 ммоль) перемешивали при к. т. в течение 1 ч с получением белой суспензии. Смесь разбавляли эфиром и твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 6-этил-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 36**, 159 мг, 100%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,31 (3H, t), 2,74-2,86 (5H, m), 3,00-3,14 (4H, m), 3,24 (4H, br s), 7,57 (1H, d), 7,82 (1H, d), 8,43 (1H, br d), 9,20 (2H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=249.

Пример 8 синтеза. 6-Этил-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,203 мл, 1,17 ммоль) добавляли к суспензии 6-этил-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 36**, 75 мг, 0,23 ммоль) и 7-(бромметил)-3-этил-1H-хиноксалин-2-она (**промежуточное соединение 30**, 69,3 мг, 0,23 ммоль) в ацетонитриле (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 60°C в течение 3 ч, результат LCMS указывал на полное превращение. Смесь охлаждали до к. т., концентрировали, остаток очищали с помощью колонки Gilson с обращенной фазой (элюировали с помощью 0-95% ACN/вода/0,1% TFA, цикл 15 мин, собирали с 5 по 9 мин). Фракции, содержащие продукт, концентрировали и затем остаток растворяли в метаноле и DCM. 300 мг карбоната тетраалкиламмония, связанного с полимером (40-90 меш, 2,5-3,5 ммоль/г), и смесь перемешивали при к. т. в течение 10 мин. Затем смесь фильтровали и промывали метанолом. Фильтрат концентрировали, повторно растворяли в смеси вода/CAN и данную смесь лиофилизировали до сухого состояния с получением 6-этил-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида (**пример 8 синтеза**, 60,0 мг, 59,1%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,22 (3H, t), 1,30 (3H, t), 2,54-2,69 (2H, m), 2,72-2,86 (7H, m), 2,93 (4H, br s), 3,26 (2H, s), 3,64 (2H, s), 7,17-7,33 (2H, m), 7,52 (1H, d), 7,69 (1H, br d), 7,80 (1H, d), 8,40 (1H, br d), 12,25 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=435.



Промежуточное соединение 37. трет-Бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-(трифторметил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

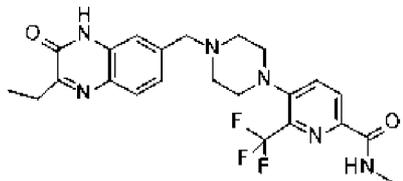
К хорошо перемешанной смеси фторида серебра(I) (176 мг, 1,39 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли триметил(трифторметил)силан (0,247 мл, 1,67 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 20 мин, затем добавляли медный порошок (133 мг, 2,09 ммоль). После перемешивания в течение 4 ч реакционная смесь приобретала голубой цвет (индикатор образования CuCF_3). К смеси добавляли трет-бутил-4-(2-бром-6-метоксикарбонил-3-пиридил)пиперазин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 33**, 150 мг, 0,38 ммоль) и полученную темную смесь перемешивали при 90°C в течение 18 ч с получением коричневой суспензии. Результат LCMS указывал на полное превращение. Смесь разбавляли этилацетатом и твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат промывали водой, затем промывали солевым раствором. Органический слой высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-70% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-(трифторметил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 37**, 146 мг, 100%) в виде желтого остатка. ^1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,50 (9H, s), 2,93-3,03 (4H, m), 3,05 (3H, d), 3,55-3,69 (4H, m), 7,71 (1H, d), 7,81 (1H, br d), 8,33 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=389$.

Промежуточное соединение 38. N-Метил-5-пиперазин-1-ил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид

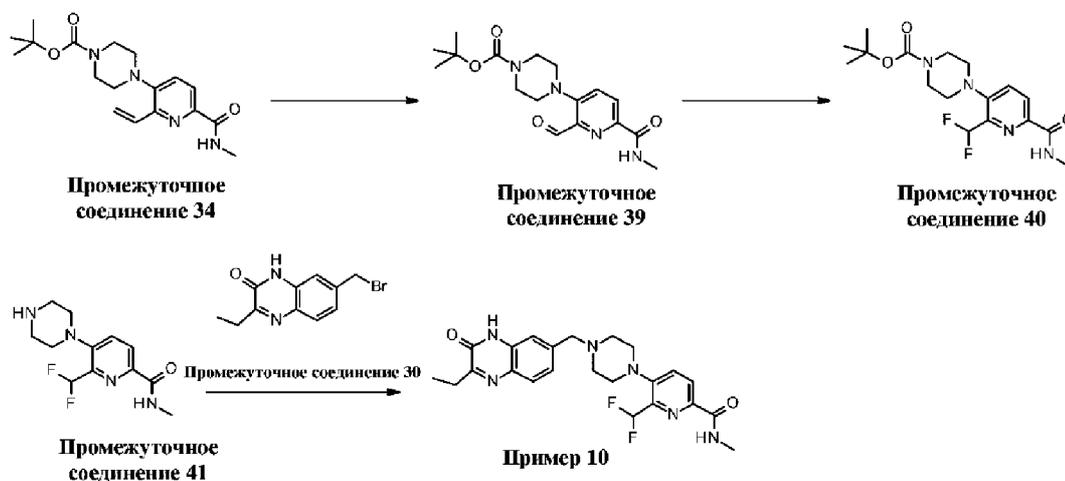
Смесь трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-(трифторметил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 37**, 146 мг, 0,38 ммоль) в HCl (4 М в диоксане, 8 мл, 32,00 ммоль) перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Результат LCMS указывал на полное превращение. Растворитель концентрировали до объема 2 мл, смесь разбавляли смесью эфир/гексаны (15 мл, 5/1). Твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением N-метил-5-пиперазин-1-ил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 38**,

127 мг, 94%) в виде розового твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 2,83 (3H, d), 3,21 (8H, br s), 8,09 (1H, d), 8,23 (1H, d), 8,46 (1H, br d), 9,08 (2H, br d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=289.

Пример 9 синтеза. 5-[4-[(2-Этил-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,121 мл, 0,69 ммоль) добавляли к суспензии N-метил-5-пиперазин-1-ил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 38**, 50 мг, 0,14 ммоль) и 7-(бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 30**, 46,2 мг, 0,14 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) и смесь перемешивали при 60°C в течение 3 ч. Смесь охлаждали до к. т., концентрировали, остаток очищали с помощью колонки Gilson с обращенной фазой (элюировали с помощью 0-95% ACN/вода/0,1% TFA). Фракции, содержащие продукт, концентрировали при комнатной температуре. Затем остаток растворяли в метаноле и DCM, после чего добавляли 250 мг карбоната тетраалкиламмония, связанного с полимером (40-90 меш, 2,5-3,5 ммоль/г), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем твердое вещество отфильтровывали, промывали метанолом и фильтрат концентрировали с получением твердого вещества. Затем данное твердое вещество повторно растворяли в смеси вода/CH₃CN и лиофилизировали до сухого состояния с получением 5-[4-[(2-этил-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид (**пример 9 синтеза**, 40,0 мг, 60,9%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,40 (3H, t), 2,70 (4H, br s), 2,98-3,08 (5H, m), 3,12 (4H, br s), 3,72 (2H, br s), 7,29-7,32 (1H, m), 7,37 (1H, dd), 7,74 (1H, d), 7,79-7,88 (2H, m), 8,33 (1H, d), 11,06 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=475.



Промежуточное соединение 39. трет-Бутил-4-[2-формил-6-

(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

Тетраоксид осмия в H_2O (0,050 мл, 6,35 мкмоль) добавляли к раствору трет-бутил-4-[6-(метилкарбамоил)-2-винил-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 34**, 110 мг, 0,32 ммоль), 2,6-лутидина (0,074 мл, 0,64 ммоль) и перйодата натрия (272 мг, 1,27 ммоль) в смеси THF (5 мл)/вода (1 мл)/трет-бутанол (0,304 мл, 3,18 ммоль) и смесь перемешивали при к. т. в течение ночи с получением желтой суспензии. Результат LCMS и TLC указывал на полное превращение. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. После концентрирования полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-100% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[2-формил-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 39**, 100 мг, 90%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,50 (9H, s), 3,07 (3H, d), 3,14-3,29 (4H, m), 3,66-3,79 (4H, m), 7,49 (1H, d), 7,86 (1H, br d), 8,28 (1H, d), 10,10 (1H, s). масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=349$.

Промежуточное соединение 40. трет-Бутил-4-[2-(дифторметил)-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

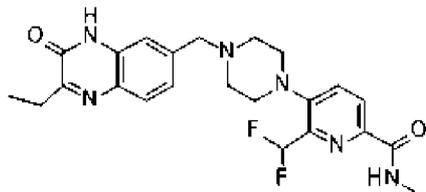
трет-Бутил-4-[2-формил-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 39**, 99 мг, 0,28 ммоль) в CH_2Cl_2 (2 мл) охлаждали до $0^\circ C$, добавляли DAST (0,710 мл, 0,71 ммоль) (1 М в DCM) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Результат TLC и LCMS указывал на полное превращение. Реакционную смесь гасили посредством добавления по каплям насыщ. раствора $NaHCO_3$ и экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические слои высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-100% EtOAc в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением трет-бутил-4-[2-(дифторметил)-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 40**, 94 мг, 89%) в виде грязно-белого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,51 (9H, s), 2,89-3,03 (4H, m), 3,06 (3H, d), 3,54-3,73 (4H, m), 6,82-7,16 (1H, m), 7,64 (1H, d), 7,94 (1H, br d), 8,29 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=371$.

Промежуточное соединение 41. 6-(Дифторметил)-N-метил-5-пиперазин-1-илтиридин-2-карбоксамид

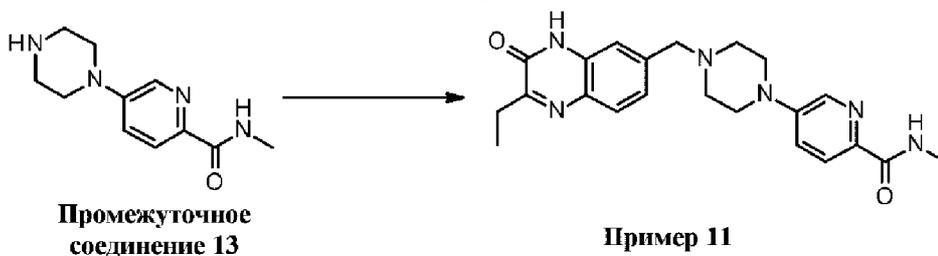
Смесь трет-бутил-4-[2-(дифторметил)-6-(метилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 40**, 92 мг, 0,25 ммоль) в 4 М HCl в 1,4-диоксане (6 мл, 24,00 ммоль) перемешивали при к. т. в течение 1,5 ч с получением оранжевой суспензии, смесь разбавляли эфиром, фильтровали, твердое вещество повторно растворяли в метаноле, концентрировали до сухого состояния с

получением 6-(дифторметил)-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 41**, 56,0 мг, 65,7%) в виде оранжевого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 2,83 (3H, d), 3,03-3,23 (5H, m), 3,30 (4H, br s), 7,06-7,49 (1H, m), 7,92 (1H, d), 8,13 (1H, d), 8,43 (1H, br d), 9,00 (2H, br d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=271.

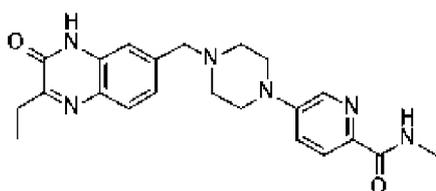
Пример 10 синтеза. 6-(Дифторметил)-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



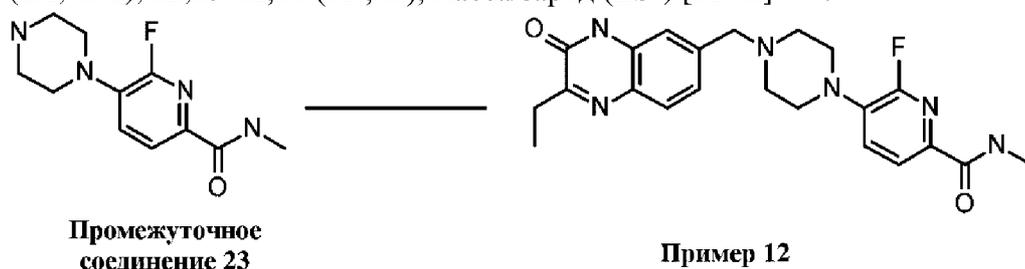
DIPEA (0,127 мл, 0,73 ммоль) добавляли к суспензии 6-(дифторметил)-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 41**, 50 мг, 0,15 ммоль) и 7-(бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 30**, 48,6 мг, 0,15 ммоль) в ацетонитриле (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 60°C в течение 3 ч, результат LCMS указывал на полное превращение. Смесь концентрировали и остаток очищали с помощью колонки Gilson с обращенной фазой (элюировали с помощью 0-95% ACN/вода/0,1% TFA). Фракции, содержащие продукт, концентрировали при комнатной температуре. Затем остаток растворяли в метаноле и DCM, после чего добавляли 250 мг карбоната тетраалкиламмония, связанного с полимером (40-90 меш, 2,5-3,5 ммоль/г), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем твердое вещество отфильтровывали, промывали метанолом и фильтрат концентрировали с получением твердого вещества. Затем данное твердое вещество повторно растворяли в смеси вода/CH₃CN и лиофилизировали до сухого состояния с получением 6-(дифторметил)-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида (**пример 10 синтеза**, 50,0 мг, 75%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) 1,40 (3H, t), 2,72 (4H, br s), 2,97-3,17 (9H, m), 3,73 (2H, s), 6,84-7,15 (1H, m), 7,32 (1H, s), 7,37 (1H, d), 7,64 (1H, d), 7,83 (1H, d), 7,95 (1H, br d), 8,29 (1H, d), 11,32-11,62 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=457.



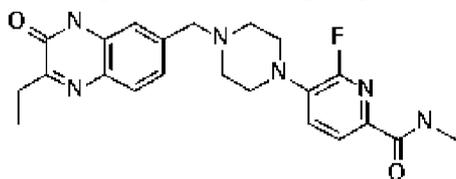
Пример 11 синтеза. 5-[4-[(2-Этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



Во флакон объемом 20 мл добавляли 7-(бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 30**, 0,147 г, 0,55 ммоль) и N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточное соединение 13**, 0,161 г, 0,55 ммоль). Флакон герметично закрывали, вакуумировали и повторно заполняли с помощью N₂. Ацетонитрил (3 мл) и DIPEA (0,481 мл, 2,75 ммоль) добавляли во флакон и помещали в термостат, предварительно нагретый до 70 С. Реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 2 часов и охлаждали до комнатной температуры. Объем реакционной смеси уменьшали до 1/3 от ее исходного объема под вакуумом и добавляли водный раствор NaHCO₃ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, фильтровали и твердое вещество промывали водой (50 мл). Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с применением 0-30% MeOH в DCM с получением 5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксиамида (**пример 11 синтеза**, 93,0 мг, 41,6%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,22 (3H, t), 2,52-2,60 (4H, m), 2,73-2,85 (5H, m), 3,30 (4H, m, Перекрывается с пиком воды пик), 3,62 (2H, s), 7,22-7,31 (2H, m), 7,39 (1H, dd), 7,69 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,23-8,31 (1H, m), 8,39 (1H, br d), 12,13-12,36 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=407.

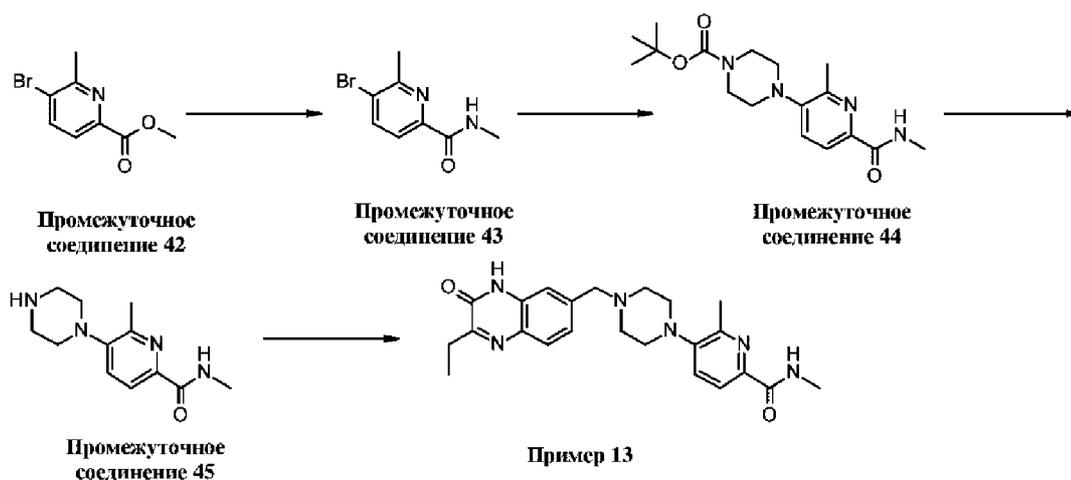


Пример 12 синтеза. 5-[4-[(2-Этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамид



7-(Бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 30**, 150 мг, 0,56 ммоль) добавляли к 6-фтор-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамиду (**промежуточное соединение 23**, 60 мг, 0,25 ммоль) и DIPEA (0,270 мл, 1,55 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали

посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, 5 мкм, 19×150 мм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃, 0,1% NH₃·H₂O), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиент: от 28% В до 38% В за 8 мин; 254; 220 нм; RT: 8,02 мин). Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[(2-этил-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 12 синтеза**, 9 мг, 42,9%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 1,33 (3H, t), 2,65-2,72 (4H, m), 2,87-2,95 (5H, m), 3,26-3,30 (4H, m), 3,71 (2H, s), 7,33-7,41 (2H, m), 7,52 (1H, dd), 7,76 (1H, d), 7,90 (1H, dd); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, CD₃OD) δ -73,40; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=425.



Промежуточное соединение 43. 5-Бром-N,6-диметилпиколинамид

2 М раствор метиламина в THF (20 мл, 40,00 ммоль) добавляли к метил-5-бром-6-метилпиколинату (**промежуточное соединение 42**, 2,0 г, 8,69 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 18 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-80% MeOH в воде (0,1% NH₄HCO₃). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 5-бром-N,6-диметилпиколинамида (**промежуточное соединение 43**, 1,5 г, 75%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,65 (3H, s), 2,82 (3H, d), 7,75 (1H, d), 8,17 (1H, d), 8,57-8,76 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=229.

Промежуточное соединение 44. трет-Бутил-4-(2-метил-6-(метилкарбамоил)пиридин-3-ил)пиперазин-1-карбоксилат

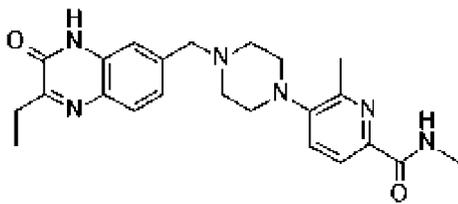
5-Бром-N,6-диметилпиколинамид (**промежуточное соединение 43**, 1,0 г, 4,37 ммоль) добавляли к трет-бутил-пиперазин-1-карбоксилату (0,894 г, 4,80 ммоль), BINAP (0,272 г, 0,44 ммоль), Pd(OAc)₂ (0,098 г, 0,44 ммоль) и Cs₂CO₃ (3,56 г, 10,91 ммоль) в толуоле (20 мл) в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 16 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-30% MeOH в воде (0,4% HCO₂H). Чистые фракции выпаривали до

сухого состояния с получением трет-бутил-4-(2-метил-6-(метилкарбамоил)пиридин-3-ил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 44**, 1,2 г, 82%) в виде коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 1,50 (9H, s), 2,58 (3H, s), 2,92-3,00 (7H, m), 3,62 (4H, m), 7,50 (1H, d), 7,88 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=335$.

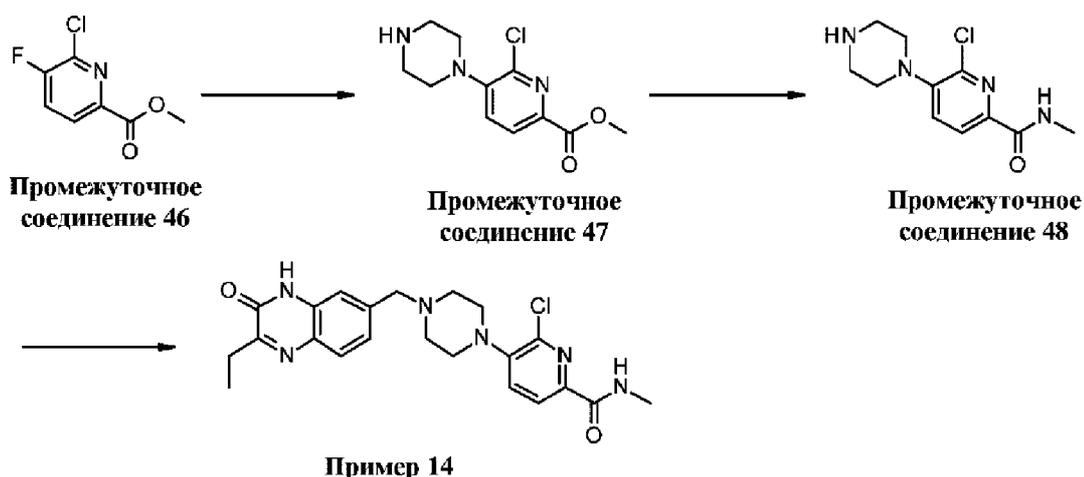
Промежуточное соединение 45. N,6-Диметил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамид

трет-Бутил-4-(2-метил-6-(метилкарбамоил)пиридин-3-ил)пиперазин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 44**, 1,18 г, 3,53 ммоль) добавляли к 4 М раствору HCl в 1,4-диоксане (10 мл, 329,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок собирали посредством фильтрации, промывали петролейным эфиром (5 мл x 2), Et_2O (5 мл x 2) и высушивали под вакуумом с получением N,6-диметил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамида (**промежуточное соединение 45**, 0,77 г, 81%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 2,86 (3H, s), 3,02 (3H, s), 3,42-3,54 (8H, m), 8,29 (2H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=235$.

Пример 13 синтез. 5-[4-[(2-Этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамид



7-(Бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 30**, 100 мг, 0,37 ммоль) добавляли к N,6-диметил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 45**, 90 мг, 0,33 ммоль) и DIPEA (0,36 мл, 2,05 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30×150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 30% В до 40% В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 6,43 мин). Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамид (**пример 13 синтез**, 68,7 мг, 43,6%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 1,33 (3H, t), 2,55 (3H, s), 2,71 (4H, s), 2,87-2,99 (5H, m), 3,05 (4H, t), 3,73 (2H, s), 7,35 (1H, s), 7,38 (1H, d), 7,49 (1H, d), 7,77 (1H, d), 7,87 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=421$.



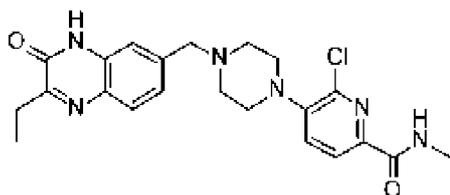
Промежуточное соединение 47. Метил-6-хлор-5-(пиперазин-1-ил)пиколинат

Пиперазин (1,0 г, 11,61 ммоль) добавляли к метил-6-хлор-5-фторпиколинату (**промежуточное соединение 46**, 1,0 г, 5,28 ммоль) в MeCN (30 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 18 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-60% MeCN в воде (0,1% NH₄HCO₃). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением метил-6-хлор-5-(пиперазин-1-ил)пиколината (**промежуточное соединение 47**, 1,28 г, 95%) в виде красного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,81-2,91 (4H, m), 3,04-3,08 (4H, m), 3,85 (3H, s), 7,61 (1H, d), 8,00 (1H, d) (протон NH не показан); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=256.

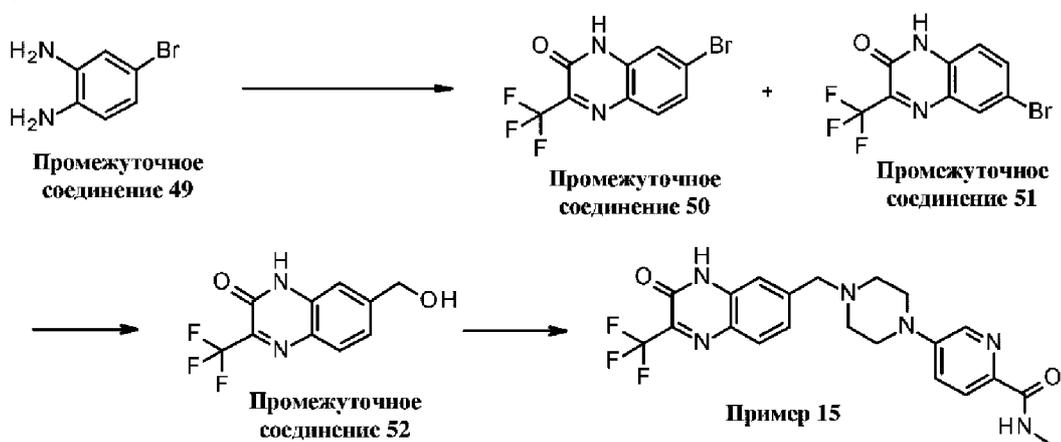
Промежуточное соединение 48. 6-Хлор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамид

2 М раствор метиламина в THF (40 мл, 80,00 ммоль) добавляли к метил-6-хлор-5-(пиперазин-1-ил)пиколинату (**промежуточное соединение 47**, 1,26 г, 4,93 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 18 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-60% MeCN в воде (0,1% NH₄HCO₃). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 6-хлор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамида (**промежуточное соединение 48**, 1,12 г, 89%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 2,79 (3H, d), 2,85-2,89 (4H, m), 2,97-3,02 (4H, m), 7,63 (1H, d), 7,94 (1H, d), 8,45 (1H, q) (протон пиперазин-NH не показан); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=255.

Пример 14 синтеза. 6-Хлор-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилтиридин-2-карбоксамид



7-(Бромметил)-3-этилхиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 30**, 200 мг, 0,75 ммоль) добавляли к 6-хлор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 48**, 100 мг, 0,39 ммоль) и DIPEA (0,358 мл, 2,05 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 30% В до 40% В за 8 мин; 254; 220 нм; RT: 7,3 мин). Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-хлор-5-[4-[(2-этил-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 14 синтеза**, 52,6 мг, 30,4%) в виде белого твердого вещества. ¹HNMR (400 МГц, CD₃OD) δ 1,33 (3H, t), 2,71 (4H, s), 2,87-2,96 (5H, m), 3,23 (4H, s), 3,73 (2H, s), 7,33-7,41 (2H, m), 7,62 (1H, d), 7,77 (1H, d), 8,00 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=441.



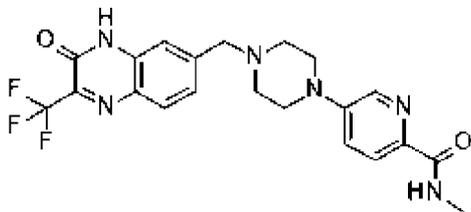
Промежуточное соединение 50. 7-Бром-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-он

4-Бромбензол-1,2-диамин (**промежуточное соединение 49**, 0,9 г, 4,81 ммоль) добавляли к метил-3,3,3-трифтор-2-оксопропаноату (0,9 г, 5,77 ммоль) в толуоле (10 мл). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 60 минут. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-50% EtOAc в петролейном эфире. Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением региоизмерной смеси 7-бром-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-она и 6-бром-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 50 и промежуточное соединение 51**, 1,28 г, 45,4%) в виде грязно-белого твердого вещества. Выделяли смесь региоизомеров и спектр ¹H ЯМР не интерпретировали; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=295.

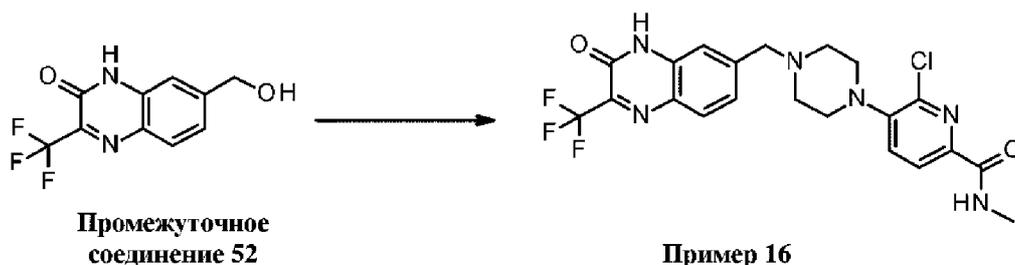
Промежуточное соединение 52. 7-(Гидроксиметил)-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-он

$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (0,3 г, 0,26 ммоль) добавляли к смеси 7-бром-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-она, и 6-бром-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 50** и **промежуточное соединение 51**, 1,2 г, 2,05 ммоль), и (трибутилстаннил)метанола (1,2 г, 3,74 ммоль) в 1,4-диоксане (40 мл). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 18 часов в атмосфере азота. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-50% MeCN в воде (0,1% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 7-(гидроксиметил)-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 52**, 0,32 г, 64,0%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 4,63 (2H, d), 5,52 (1H, t), 7,30 (1H, dd), 7,38 (1H, d), 7,83 (1H, d), 13,05 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=245$.

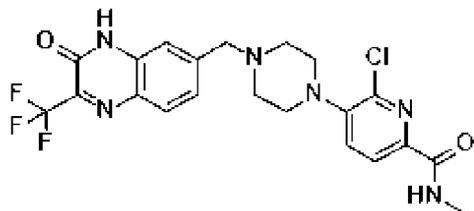
Пример 15 синтеза. N-Метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид



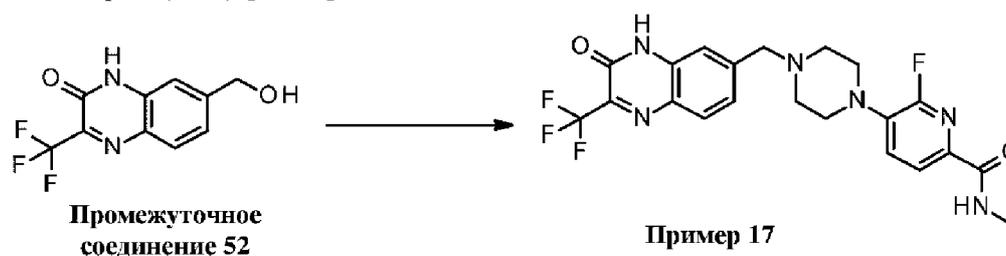
Раствор 33% NH_4Cl в AcOH (3 мл, 18,23 ммоль) добавляли к 7-(гидроксиметил)-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 52**, 111 мг, 0,45 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. DIEA (0,5 мл, 2,86 ммоль) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамид (**промежуточное соединение 13**, 100 мг, 0,45 ммоль) добавляли к вышеуказанной смеси в NMP (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 22 В до 32 В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 5,77. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 15 синтеза**, 44,0 мг, 21,71%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 2,55-2,62 (m, 4H), 2,78 (d, 3H), 3,34-3,38 (t, 4H), 3,69 (s, 2H), 7,34-7,44 (m, 3H), 7,80-7,91 (m, 2H), 8,27 (d, 1H), 8,36-8,41 (m, 1H), 12,97 (s, 1H); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ -68,36; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=447$.



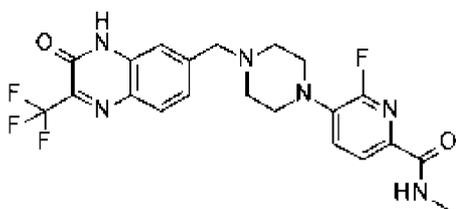
Пример 16 синтеза. 6-Хлор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид



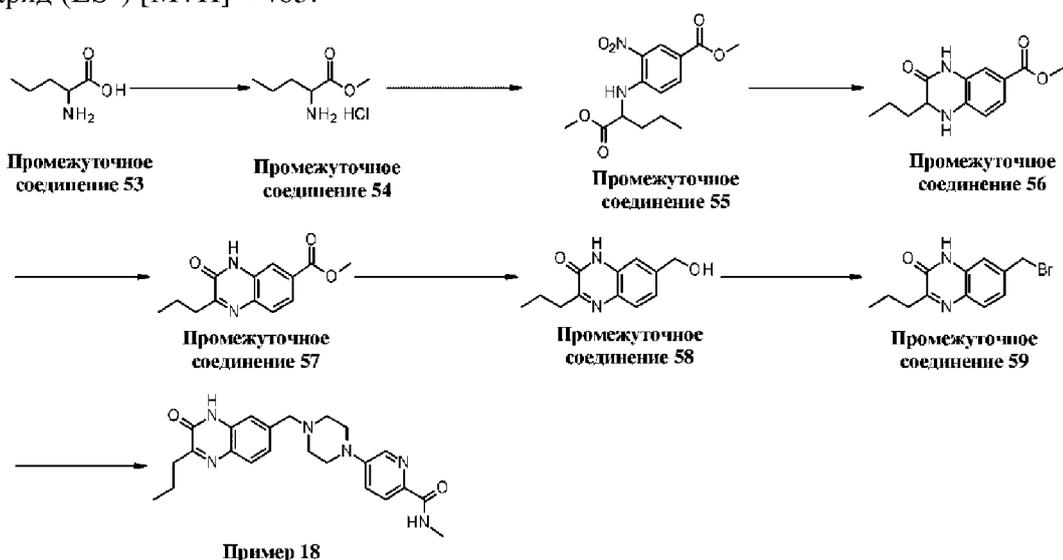
33% НВг в АсОН (3 мл, 18,23 ммоль) добавляли к 7-(гидроксиметил)-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1Н)-ону (**промежуточное соединение 52**, 43,1 мг, 0,18 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. DIPEA (0,5 мл, 2,86 ммоль) и 6-хлор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамид (**промежуточное соединение 48**, 45 мг, 0,18 ммоль) добавляли к вышеуказанной смеси в NMP (5 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: АСN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 10 В до 50 В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 6,75. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-хлор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 16 синтеза**, 22,00 мг, 25,9%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,56-2,64 (s, 4H), 2,79 (d, 3H), 3,09-3,17 (m, 4H), 3,71 (s, 2H), 7,36-7,42 (m, 2H), 7,67 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,39-8,44 (m, 1H), 12,89 (s, 1H); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO) δ -68,41; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=481.



Пример 17 синтеза. 6-Фтор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид



33% НВг в АсОН (3 мл, 55,25 ммоль) добавляли к 7-(гидроксиметил)-3-(трифторметил)хиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 52**, 102 мг, 0,42 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. 6-Фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамид (**промежуточное соединение 23**, 100 мг, 0,42 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,86 ммоль) добавляли к вышеуказанной смеси в NMP (5 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 15 В до 40 В за 8 мин; 254; 220 нм; RT: 7,2. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-фтор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(трифторметил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида (**пример 17 синтеза**, 66,0 мг, 33,9%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,55-2,69 (m, 4H), 2,77 (d, 3H), 3,15-3,23 (m, 4H), 3,69 (s, 2H), 7,33-7,46 (m, 2H), 7,58 (dd, 1H), 7,78-7,93 (m, 2H), 8,37-8,42 (m, 1H), 12,99 (s, 1H); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -68,36,-72,52; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=465.



Промежуточное соединение 54. Гидрохлорид метил-2-аминопентаноата

SOCl₂ (17 мл, 232,94 ммоль) по каплям добавляли к 2-аминопентановой кислоте (**промежуточное соединение 53**, 10,0 г, 85,36 ммоль) в MeOH (200 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением гидрохлорида метил-2-аминопентаноата (**промежуточное соединение 54**, 15,78 г, 110%) в виде белого

твердого вещества. ^1H ЯМР (DMSO- d_6 , 400 МГц) δ 0,88 (3H, t), 1,19-1,51 (2H, m), 1,67-1,83 (2H, m), 3,74 (3H, s), 3,89-3,93 (1H, m), 8,64 (3H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=132$.

Промежуточное соединение 55. Метил-4-(1-метокси-1-оксопентан-2-иламино)-3-нитробензоат

Бикарбонат натрия (20,0 г, 238,08 ммоль) добавляли к гидрохлориду метил-2-аминопентаноата (**промежуточное соединение 54**, 15,57 г, 92,88 ммоль) и метил-4-фтор-3-нитробензоату (9,0 г, 45,19 ммоль) в THF (160 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (150 мл) и последовательно промывали водой (100 мл x 1), насыщенным NaHCO_3 (100 мл x 1) и насыщенным соевым раствором (100 мл x 1). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали с получением метил-4-(1-метокси-1-оксопентан-2-иламино)-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 55**, 14,09 г, 100%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,89 (3H, t), 1,26-1,41 (2H, m), 1,84-1,94 (2H, m), 3,73 (3H, s), 3,83 (3H, s), 4,68-4,75 (1H, m), 7,12 (1H, d), 8,00 (1H, d), 8,60 (1H, d), 8,63 (1H, d); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=311$.

Промежуточное соединение 56. Метил-3-оксо-2-пропил-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат

$\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20 вес. %, 1,58 г, 2,25 ммоль) добавляли к метил-4-((1-метокси-1-оксопентан-2-ил)амино)-3-нитробензоату (**промежуточное соединение 55**, 14,05 г, 45,28 ммоль) в MeOH (300 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H_2 в течение 30 часов. Реакционную смесь фильтровали. Осадок промывали с помощью DMF (100 мл) и фильтрат выпаривали до сухого состояния с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт промывали с помощью DCM (10 мл) и высушивали под вакуумом с получением метил-3-оксо-2-пропил-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 56**, 9,12 г, 81%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,87 (3H, t), 1,32-1,46 (2H, m), 1,57-1,64 (2H, m), 3,74 (3H, s), 3,88-3,93 (1H, m), 6,70 (1H, d), 6,83 (1H, d), 7,32 (1H, d), 7,40 (1H, dd), 10,38 (1H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=249$.

Промежуточное соединение 57. Метил-3-оксо-2-пропил-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

DDQ (9,42 г, 41,50 ммоль) добавляли к метил-3-оксо-2-пропил-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 56**, 9,12 г, 36,73 ммоль) в 1,4-диоксане (200 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Реакционную смесь разбавляли насыщенным NaHCO_3 (200 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 часа. Осадок собирали посредством фильтрации, промывали водой (1000 мл) и высушивали под вакуумом с получением метил-3-оксо-2-пропил-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 57**, 7,86 г, 87%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,98 (3H, t), 1,68-

1,80 (2H, m), 2,75-2,83 (2H, m), 3,89 (3H, s), 7,73-7,85 (2H, m), 7,88 (1H, d), 12,45 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=247$.

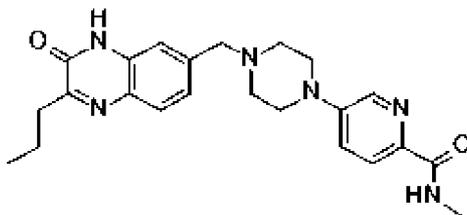
Промежуточное соединение 58. 7-(Гидроксиметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-он

1 М раствор DIBAL-H в THF (100 мл, 100,00 ммоль) по каплям добавляли к метил-3-оксо-2-пропил-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 57**, 7,81 г, 31,71 ммоль) в THF (200 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (5 мл) и насыщенного водного раствора тетрагидрата тартрата монокалия-моносодия (20 мл), органический слой выпаривали с получением 7-(гидроксиметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 58**, 1,2 г, 17,34%) в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,97 (3H, t), 1,36-1,77 (2H, m), 2,71-2,79 (2H, m), 4,59 (2H, s), 5,39 (1H, s), 7,18 (1H, dd), 7,27 (1H, d), 7,65 (1H, d), 12,30 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=219$.

Промежуточное соединение 59. 7-(Бромметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-он

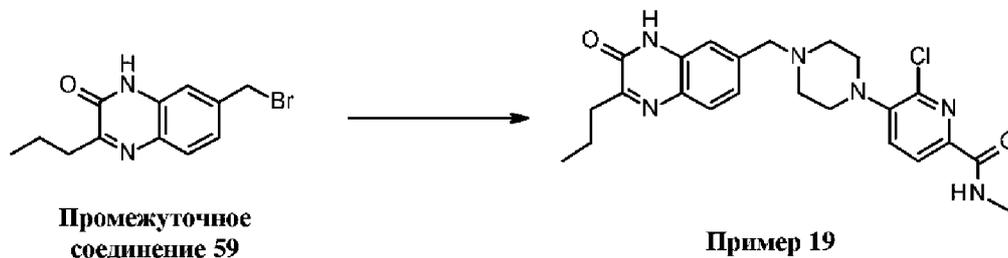
33% HBr в AcOH (74,6 мкл, 1,37 ммоль) добавляли к 7-(гидроксиметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 58**, 300 мг, 1,37 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 7-(бромметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 59**, 600 мг, 155%) в виде коричневого твердого вещества (неочищенный продукт не являлся чистым и содержал AcOH и другие примеси. Продукт применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. 1H ЯМР спектр не являлся чистым и его не интерпретировали; масса/заряд (ES^+) $[M+H]^+=282$.

Пример 18 синтеза. N-Метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]тиридин-2-карбоксамид

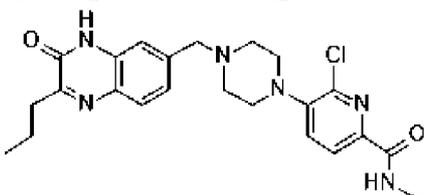


DIPEA (200 мкл, 1,15 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 59**, 200 мг, 0,71 ммоль) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 13**, 80 мг, 0,36 ммоль) в NMP (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, 19×250 мм, 10 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3 , 0,1% $NH_3 \cdot H_2O$), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиент: от 38 В до 50 В за 7 мин; 254/220 нм; RT: 6,20. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-

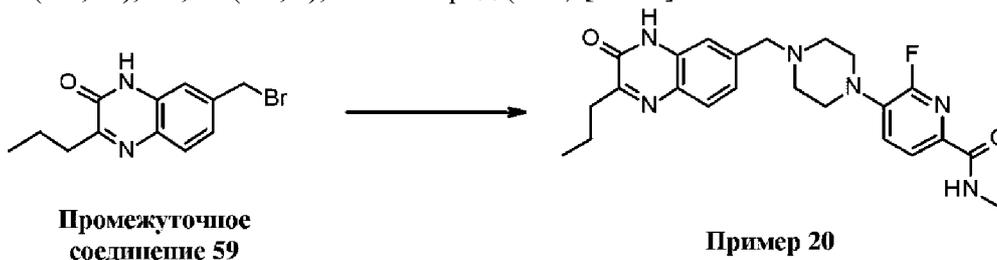
ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 18 синтеза**, 71,0 мг, 46,5%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,97 (3H, t), 1,66-1,80 (2H, m), 2,55-2,61 (4H, m), 2,73-2,85 (5H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,62 (2H, s), 7,19-7,31 (2H, m), 7,40 (1H, dd), 7,68 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,35-8,45 (1H, m), 12,26 (1H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=421$.



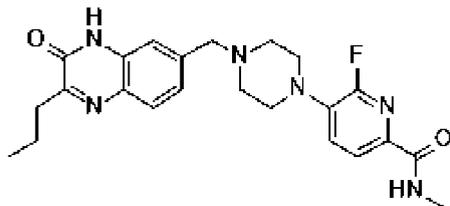
Пример 19 синтеза. 6-Хлор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид



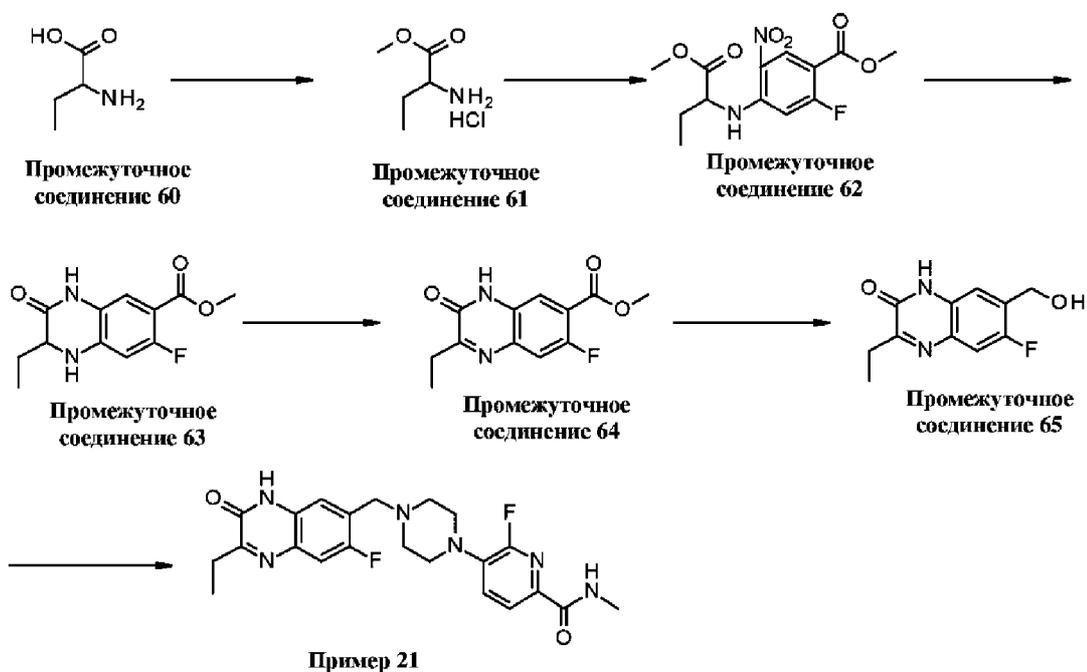
DIPEA (200 мкл, 1,15 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 59**, 200 мг, 0,71 ммоль) и 6-хлор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 48**, 80 мг, 0,31 ммоль) в NMP (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, 19×250 мм, 10 мкм; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO $_2$ N), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиент: от 18 В до 30 В за 7 мин; 254/220 нм; RT: 5,93. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-хлор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 19 синтеза**, 52,0 мг, 36,4%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,97 (3H, t), 1,66-1,79 (2H, m), 2,55-2,65 (4H, m), 2,71-2,85 (5H, m), 3,06-3,12 (4H, m), 3,64 (2H, s), 7,20-7,32 (2H, m), 7,64-7,72 (2H, m), 7,94 (1H, d), 8,40-8,50 (1H, m), 12,27 (1H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=455$.



Пример 20 синтеза. 6-Фтор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-

ил)метил]пиперазин-1-ил]тиридин-2-карбоксамид

DIPEA (500 мкл, 2,86 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-пропилхиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 59**, 200 мг, 0,71 ммоль) и 6-фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду, 2 HCl (**промежуточное соединение 23**, 100 мг, 0,32 ммоль) в NMP (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: SunFire C18 OBD Prep, 100 Å, 5 мкм, 19 мм x 250 мм; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO₂H), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 25 мл/мин; градиент: от 10 В до 20 В за 13 мин; 254/220 нм; RT: 12,13. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-фтор-N-метил-5-[4-[(3-оксо-2-пропил-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 20 синтеза**, 71,0 мг, 50,4%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 0,97 (3H, t), 1,66-1,78 (2H, m), 2,54-2,60 (4H, m), 2,71-2,83 (5H, m), 3,14-3,25 (4H, m), 3,62 (2H, s), 7,19-7,33 (2H, m), 7,57 (1H, dd), 7,68 (1H, d), 7,85 (1H, dd), 8,37-5,43 (1H, m), 12,27 (1H, s); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -72,51; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=439.

**Промежуточное соединение 61. Гидрохлорид метил-2-аминобутаноата**

SOCl₂ (17 мл, 232,94 ммоль) по каплям добавляли к 2-аминомасляной кислоте (**промежуточное соединение 60**, 10,0 г, 96,97 ммоль) в MeOH (100 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов.

Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением гидрохлорида метил-2-аминобутаноата (**промежуточное соединение 61**, 14,84 г, 100%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,91 (3H, t), 1,75-1,95 (2H, m), 3,73 (3H, s), 3,93 (1H, t), 8,72 (3H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=118$.

Промежуточное соединение 62. Метил-2-фтор-4-(1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)-5-нитробензоат

DIPEA (4,02 мл, 23,03 ммоль) добавляли к метил-2,4-дифтор-5-нитробензоату (1,0 г, 4,61 ммоль) и гидрохлориду метил-2-аминобутаноата (**промежуточное соединение 61**, 0,707 г, 4,61 ммоль) в NMP (10 мл). Полученную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 часов. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-80% MeCN в воде (0,1% NH_4HCO_3). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением метил-2-фтор-4-(1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)-5-нитробензоата (**промежуточное соединение 62**, 1,2 г, 83%) в виде черного твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 0,88 (3H, t), 1,78-2,03 (2H, m), 3,75 (3H, s), 3,83 (3H, s), 4,73-4,80 (1H, m), 7,06 (1H, d), 8,66-8,72 (2H, m); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=315$.

Промежуточное соединение 63. Метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат

Метил-2-фтор-4-((1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-нитробензоат (**промежуточное соединение 62**, 1,15 г, 3,66 ммоль) добавляли к 20 вес. % $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (500 мг, 0,71 ммоль) в MeOH (300 мл) и этилацетату (50 мл) в атмосфере водорода. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Реакция не протекала до завершения. Реакционную смесь фильтровали. Органический слой выпаривали с получением неочищенного продукта, метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 63**, 0,780 г, 85%), в виде коричневой смолы. Неочищенный продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. Неочищенный продукт не являлся чистым, и спектр ^1H ЯМР не интерпретировали; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=253$.

Промежуточное соединение 64. Метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

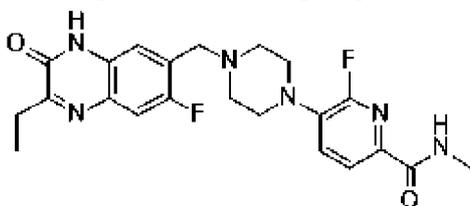
Метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат (**промежуточное соединение 63**, 760 мг, 3,01 ммоль) добавляли к DDQ (821 мг, 3,62 ммоль) в DCM (20 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакция протекала до завершения. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Насыщенный водн. раствор NaHCO_3 (10 мл) добавляли к твердому веществу и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок фильтровали и промывали дополнительным количеством водн. раствора NaHCO_3 (10 мл x 5). Твердое вещество высушивали под вакуумом с получением метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 64**, 750 мг, 99%) в

виде коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 1,20 (3 H, t), 2,82 (2 H, q), 3,87 (3 H, s), 7,65 (1 H, d), 7,76 (1 H, d), 12,42 (1 H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=251$.

Промежуточное соединение 65. 3-Этил-6-фтор-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он

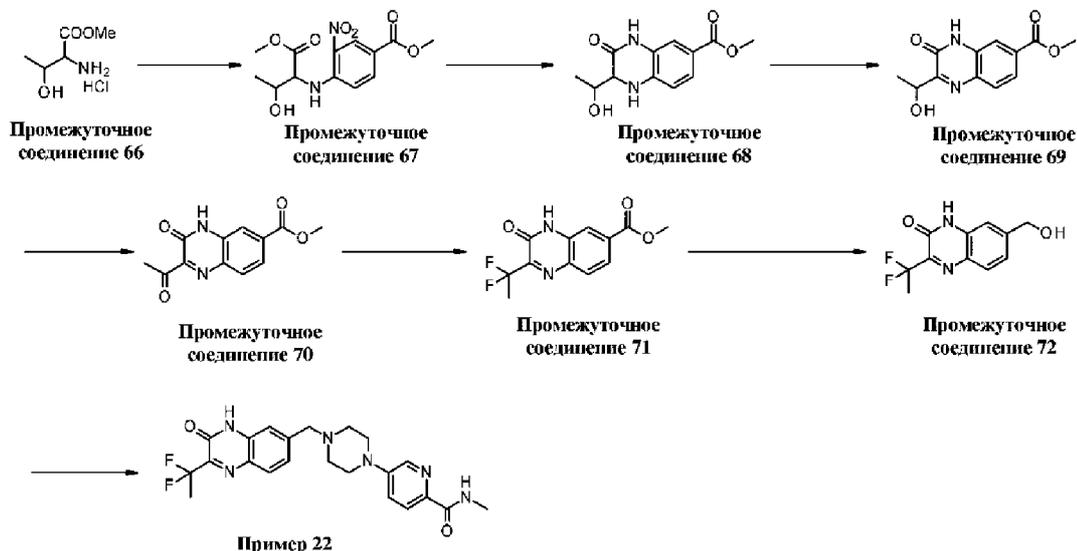
1 М раствор гидроксида диизобутилалюминия в THF (15,35 мл, 15,35 ммоль) частями добавляли к метил-2-этил-7-фтор-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 64**, 640 мг, 2,56 ммоль) в THF (300 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакция протекала до завершения. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором тартрата калия-натрия (20 мл) и MeOH (10 мл) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали и промывали с помощью THF (50 мл x 3). Органический слой выпаривали до сухого состояния с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-60% MeOH в воде (0,4% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 3-этил-6-фтор-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 65**, 110 мг, 19,37%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР(400 МГц, DMSO-d_6) δ 1,21 (3H, t), 2,80 (2H, q), 4,63 (2H, d), 5,49 (1H, t), 7,41 (1H, d), 7,49 (1H, d), 12,36 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=223$.

Пример 21 синтеза. 5-[4-[(2-Этил-7-фтор-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилтиридин-2-карбоксамид



3-Этил-6-фтор-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 65**, 50 мг, 0,23 ммоль) добавляли к 33% HBr в AcOH (2 мл, 12,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Реакционную смесь выпаривали под вакуумом с получением 7-(бромметил)-3-этил-6-фторхиноксалин-2(1H)-она (неочищенный продукт). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. DIPEA (0,196 мл, 1,13 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-этил-6-фторхиноксалин-2(1H)-ону и 6-фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 23**, 70 мг, 0,29 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Полученную смесь очищали посредством препаративной HPLC (колонка: Sunfire Prep C18, 30×150 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: вода (0,1% HCO_2H), подвижная фаза B: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 10 B до 35 B за 8 мин; 254/220 нм; RT: 7,37. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-

[(2-этил-7-фтор-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил)метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 21 синтеза**, 55,0 мг, 53,7%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР(400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,21 (3H, t), 2,61 (4H, m), 2,73-2,85 (5H, m), 3,18 (4H, m), 3,68 (2H, s), 7,38 (1H, d), 7,51-7,61 (2H, m), 7,84 (1H, dd), 8,13 (0,29H, s), 8,38 (1H, m), 12,29 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO- d_6) δ -72,53, -124,31; масса/заряд (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+=443$.



Промежуточное соединение 67. Метил-4-((3-гидрокси-1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)-3-нитробензоат

DIPEA (8,77 мл, 50,22 ммоль) добавляли к метил-4-фтор-3-нитробензоату (2,0 г, 10,04 ммоль) и гидрохлориду метил-2-амино-3-гидроксипропаноата (**промежуточное соединение 66**, 2,04 г, 12,05 ммоль) в DMF (20 мл). Полученную смесь перемешивали при к. т. в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и последовательно промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl (100 мл x 1) и соевым раствором (100 мл x 4). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали с получением требуемого продукта, метил-4-((3-гидрокси-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 67**, 2,9 г, 92%), в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,15-1,27 (3H, m), 3,64-3,74 (3H, m), 3,83 (3H, s), 4,08-4,44 (1H, m), 4,61-4,72 (1H, m), 5,39-5,60 (1H, m), 7,03-7,15 (1H, m), 7,90-8,03 (1H, m), 8,62-8,69 (1H, m), 8,73-8,89 (1H, m); масса/заряд (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+=313$.

Промежуточное соединение 68. Метил-2-((1-гидроксиэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксамид

20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0,648 г, 0,92 ммоль) добавляли к метил-4-((3-гидрокси-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоату (**промежуточное соединение 67**, 2,88 г, 9,22 ммоль) в MeOH (300 мл) в атмосфере водорода. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакция протекала до завершения. Реакционную смесь фильтровали через целит. Органический слой выпаривали с получением метил-2-((1-гидроксиэтил)-3-оксо-1,2,3,4-

тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 68**, 2,290 г, 99%) в виде серого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,07 (3H, m), 2,81 (1H, d), 3,72 (1H, m), 3,74 (3H, s), 4,78 (1H, d), 6,70-6,86 (2H, m), 7,27 (1H, d), 7,37 (1H, dd), 10,38 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=251$.

Промежуточное соединение 69. Метил-2-(1-гидроксиэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

DDQ (2,265 г, 9,98 ммоль) добавляли к метил-2-(1-гидроксиэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 68**, 2,27 г, 9,07 ммоль) в DCM (100 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакция протекала до завершения. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Насыщенный водн. раствор NaHCO_3 (100 мл) добавляли к твердому веществу и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок фильтровали и промывали дополнительным количеством водн. раствора NaHCO_3 (30 мл x 3). Твердое вещество высушивали под вакуумом с получением метил-2-(1-гидроксиэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 69**, 2,24 г, 99%) в виде серого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,40 (3H, d), 3,88 (3H, s), 4,94 (1H, q), 7,69 (1H, dd), 7,77 (1H, d), 7,90 (1H, d) (2 протона не показаны); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=249$.

Промежуточное соединение 70. Метил-2-ацетил-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

Периодат Десса-Мартина (2,56 г, 6,04 ммоль) добавляли к метил-2-(1-гидроксиэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 69**, 1,0 г, 4,03 ммоль) в DCM (30 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-30% MeCN в воде (0,4% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением метил-2-ацетил-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 70**, 0,62 г, 62,5%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 2,58 (3H, s), 3,91 (3H, s), 7,84 (1H, dd), 7,91-8,03 (2H, m), 12,86 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=247$.

Промежуточное соединение 71. Метил-2-(1,1-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

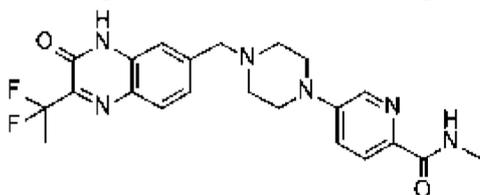
BAST (1,35 мл, 7,31 ммоль) добавляли к метил-2-ацетил-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 70**, 600 мг, 2,44 ммоль) в DCM (20 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-30% MeCN в воде (0,4% HCO_2H). Чистые

фракции выпаривали до сухого состояния с получением метил-2-(1,1-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 71**, 174 мг, 26,6%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 2,07 (3H, t), 3,91 (3H, s), 7,84 (1H, dd), 7,92-7,99 (2H, m), 12,90 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ -93,26; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=269$.

Промежуточное соединение 72. 3-(1,1-Дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он

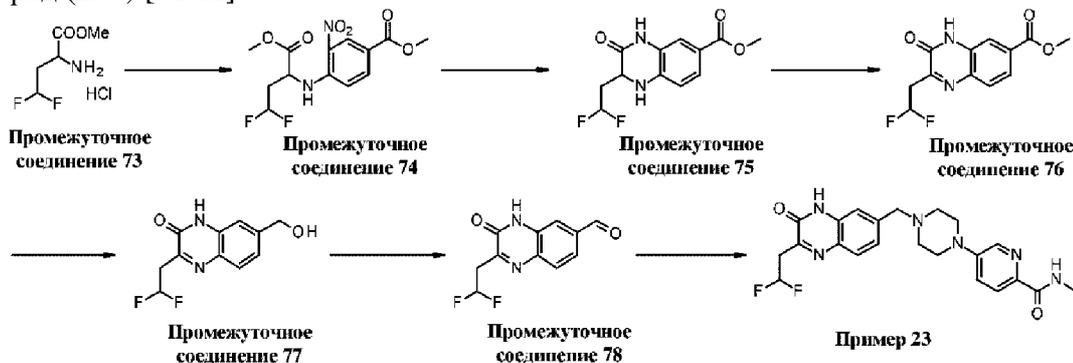
Раствор 1 М гидроксида диизобутилалюминия в THF (2,39 мл, 2,39 ммоль) добавляли к метил-2-(1,1-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 71**, 160 мг, 0,60 ммоль) в THF (50 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором тартрата калия-натрия (3 мл) и MeOH (1 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и промывали с помощью THF (10 мл x 3). Органический слой выпаривали с получением неочищенного продукта, 3-(1,1-дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 72**, 120 мг, 84%). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 2,06 (3H, t), 4,63 (2H, s), 5,47 (1H, s), 7,26 (1H, dd), 7,35 (1H, d), 7,78 (1H, d), 12,75 (1H, br s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=241$.

Пример 22 синтеза. 5-[4-[[2-(1,1-Дифторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилтиридин-2-карбоксамид



3-(1,1-Дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 72**, 60 мг, 0,25 ммоль) добавляли к 33% НВг в уксусной кислоте (2 мл, 12,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Реакционную смесь выпаривали под вакуумом с получением 7-(бромметил)-3-(1,1-дифторэтил)хиноксалин-2(1H)-она (неочищенного продукта). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. DIPEA (0,218 мл, 1,25 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-(1,1-дифторэтил)хиноксалин-2(1H)-ону (неочищенному продукту) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 13**, 60 мг, 0,27 ммоль) в NMP (3 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали и очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, 30×150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (0,05% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 13 В до 33 В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 5,70.

Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[[2-(1,1-дифторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксиамида (**пример 22 синтеза**, 47,8 мг, 43,2%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 2,06 (3H, t), 2,52-2,62 (4H, m), 2,78 (3H, d), 3,30-3,40 (4H, m), 3,67 (2H, s), 7,32-7,42 (3H, m), 7,80-7,86 (2H, m), 8,27 (1H, d), 8,34-8,42 (1H, m), 12,70 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO- d_6) δ -92,74; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=443$.



Промежуточное соединение 74. Метил-4-(4,4-дифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)-3-нитробензоат

DIPEA (8,77 мл, 50,22 ммоль) добавляли к метил-4-фтор-3-нитробензоату (2,0 г, 10,04 ммоль) и гидрохлориду метил-2-амино-4,4-дифторбутаноата (**промежуточное соединение 73**, 2,0 г, 10,55 ммоль) в DMF (20 мл). Полученную смесь перемешивали при 40°C в течение 8 часов. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и последовательно промывали насыщенным NH_4Cl (100 мл x 1) и соевым раствором (100 мл x 4). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали с получением требуемого продукта, метил-4-((4,4-дифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоата (**промежуточное соединение 74**, 2,5 г, 74,9%), в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6) δ 2,50-2,76 (2H, m), 3,71 (3H, s), 3,82 (3H, s), 4,95 (1H, q), 6,22 (1H, tt), 7,18 (1H, d), 7,99 (1H, dd), 8,63 (1H, d), 8,66 (1H, d); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=333$.

Промежуточное соединение 75. Метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат

20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0,465 г, 0,66 ммоль) добавляли к метил-4-((4,4-дифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоату (**промежуточное соединение 74**, 2,2 г, 6,62 ммоль) в MeOH (300 мл) в атмосфере водорода. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит. Фильтрат выпаривали с получением метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 75**, 1,64 г, 92%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 2,24-2,32 (2H, m), 3,76 (3H, s), 4,10-4,18 (1H, m), 6,27 (1H, tt), 6,73 (1H, d), 6,89 (1H, s), 7,37 (1H, d), 7,44 (1H, dd), 10,58 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=271$.

Промежуточное соединение 76. Метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

DDQ (1,478 г, 6,51 ммоль) добавляли к метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 75**, 1,6 г, 5,92 ммоль) в DCM (100 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную смесь удаляли при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Насыщенный водн. раствор NaHCO_3 (100 мл) добавляли к твердому веществу и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок фильтровали и промывали дополнительным количеством водн. раствора NaHCO_3 (30 мл x 3). Твердое вещество высушивали под вакуумом с получением метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 76**, 1,58 г, 99%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 3,46 (2H, td), 3,90 (3H, s), 6,57 (1H, t), 7,79-7,92 (3H, m), 12,68 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=269$.

Промежуточное соединение 77. 3-(2,2-Дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он

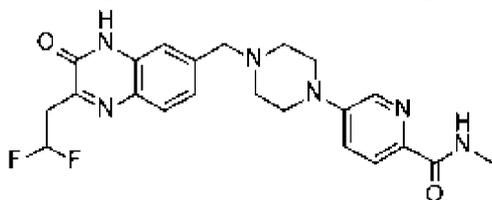
1 М раствор гидроксида диизобутилалюминия в THF (22,37 мл, 22,37 ммоль) частями добавляли к метил-2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 76**, 1,0 г, 3,73 ммоль) в THF (100 мл) при 0°C . Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором тартрата калия-натрия (20 мл) и MeOH (10 мл) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и промывали с помощью THF (30 мл x 3). Органический слой выпаривали с получением 3-(2,2-дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-она (0,72 г, 80%) в виде красного твердого вещества (неочищенный продукт). Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-60% MeOH в воде (0,4% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 3-(2,2-дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 77**, 500 мг, 69,4%) в виде красного твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 3,42 (2H, td), 4,61 (2H, s), 5,42 (1H, brs), 6,56 (1H, tt), 7,23 (1H, dd), 7,32 (1H, d), 7,71 (1H, d), 12,55 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=241$.

Промежуточное соединение 78. 2-(2,2-Дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегид

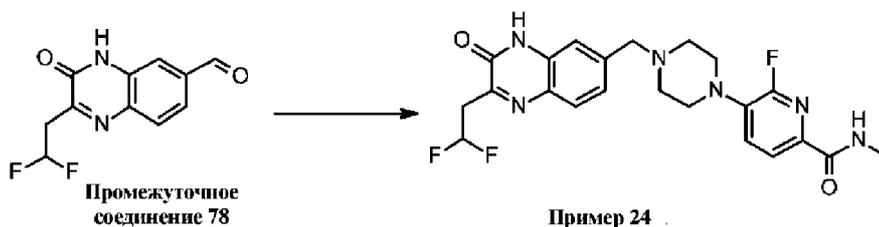
Периодат Десса-Мартина (530 мг, 1,25 ммоль) добавляли к 3-(2,2-дифторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 77**, 200 мг, 0,83 ммоль) в DCM (5 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-30% MeCN в воде (0,4% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали

до сухого состояния с получением 2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегида (**промежуточное соединение 78**, 160 мг, 81%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 3,47 (2H, td), 6,58 (1H, tt), 7,77-7,85 (2H, m), 7,90-7,98 (1H, m), 10,09 (1H, s), 12,79 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=239$.

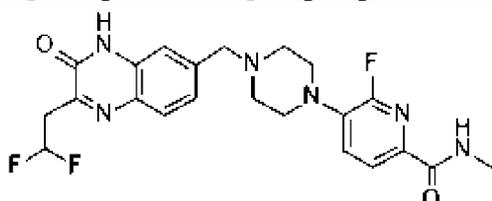
Пример 23 синтеза. 5-[4-[[2-(2,2-Дифторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



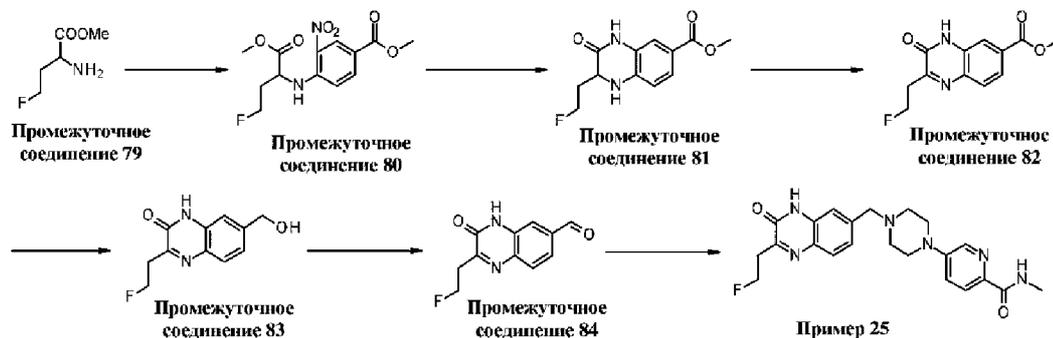
Изопропоксид титана (65,6 мг, 0,23 ммоль) добавляли к 2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегиду (**промежуточное соединение 78**, 55 мг, 0,23 ммоль) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 13**, 60 мг, 0,23 ммоль) в THF (2 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 минут. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (196 мг, 0,92 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (0,1 мл). Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта, который очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Shield RP18 OBD, 30×150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (0,05% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 13 В до 33 В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 5,70. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[[2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 23 синтеза**, 8,76 мг, 8,57%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 2,56 (4H, m), 2,78 (3H, d), 3,32-3,48 (6H, m), 3,64 (2H, s), 6,55 (1H, tt), 7,27-7,33 (2H, m), 7,39 (1H, dd), 7,73 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,37 (1H, m), 12,49 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ -114,29; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=443$.



Пример 24 синтеза. 5-[4-[[2-(2,2-Дифторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиридин-2-карбоксамид



Изопропоксид титана (59,7 мг, 0,21 ммоль) добавляли к 2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегиду (**промежуточное соединение 78**, 50 мг, 0,21 ммоль) и 6-фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 23**, 50,0 мг, 0,21 ммоль) в THF (2 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 минут. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (178 мг, 0,84 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакция протекала до завершения. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (0,1 мл). Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: Sunfire Prep C18, 30×150, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO₂H), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 2 В до 27 В за 7 мин; 254/220 нм; RT: 6,78. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[[2-(2,2-дифторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-6-фтор-N-метилпиперидин-2-карбоксамида (**пример 24 синтеза**, 21,72 мг, 22,13%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,54-2,61 (4H, m), 2,76 (3H, d), 3,14-3,22 (4H, m), 3,41 (2H, td), 3,64 (2H, s), 6,39-6,71 (1H, m), 7,26-7,33 (2H, m), 7,57 (1H, dd), 7,73 (1H, d), 7,82-7,86 (1H, m), 8,13 (0,16H, s), 8,37 (1H, m), 12,49 (1H, s); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -72,52, -114,29; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=461.



Промежуточное соединение 80. Метил-4-(4-фтор-1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)-3-нитробензоат

DIPEA (8,77 мл, 50,22 ммоль) добавляли к метил-4-фтор-3-нитробензоату (2,0 г, 10,04 ммоль) и гидрoхлориду метил-2-амино-4-фторбутианоата (**промежуточное соединение 79**, 1,81 г, 10,55 ммоль) в DMF (20 мл). Полученную смесь перемешивали при 40°C в течение 8 часов. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и последовательно промывали насыщенным NH₄Cl (100 мл x 1) и соевым раствором (100 мл x 4). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали с получением требуемого продукта, метил-4-((4-фтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоата (**промежуточного соединения 80**, 2,5 г, 79%), в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 2,25-2,35 (1H, m), 2,35-2,45 (1H, m), 3,71 (3H, s), 3,82 (3H, s), 4,36-4,58 (1H, m), 4,56-4,74 (1H, m), 4,84 (1H, q), 7,14 (1H, d), 7,99 (1H, dd), 8,63 (1H, d), 8,67 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=315.

Промежуточное соединение 81. Метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат

20% Pd(OH)₂/C (0,547 г, 0,78 ммоль) добавляли к метил-4-((4-фтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-нитробензоату (**промежуточное соединение 80**, 2,45 г, 7,80 ммоль) в MeOH (300 мл) в атмосфере водорода. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакция протекала до завершения. Реакционную смесь фильтровали через целит. Фильтрат выпаривали с получением метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 81**, 1,9 г, 97%) в виде серого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 1,91-2,19 (2H, m), 3,75 (3H, s), 4,03 (1H, m), 4,49-4,73 (2H, m), 6,73 (1H, d), 6,91 (1H, d), 7,35 (1H, d), 7,42 (1H, dd), 10,46 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=253.

Промежуточное соединение 82. Метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

DDQ (1,83 г, 8,07 ммоль) добавляли к метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 81**, 1,85 г, 7,33 ммоль) в DCM (100 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную смесь удаляли при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Водн. насыщенный раствор NaHCO₃ (100 мл) добавляли к твердому веществу и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок фильтровали и промывали дополнительным количеством водн. раствора NaHCO₃ (30 мл x 3). Твердое вещество высушивали под вакуумом с получением метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 82**, 1,8 г, 98%) в виде серого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 3,23 (2H, dt), 3,89 (3H, s), 4,90 (2H, dt), 7,76-7,85 (2H, m), 7,88 (1H, d), 12,55 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=251.

Промежуточное соединение 83. 3-(2-Фторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-он

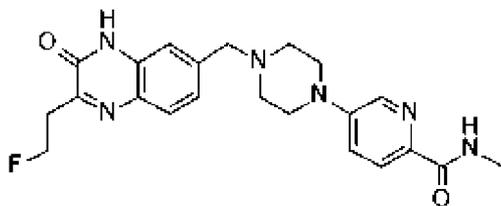
1 M раствор гидроксида диизобутилалюминия в THF (15,99 мл, 15,99 ммоль) частями добавляли к метил-2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 82**, 1,0 г, 4,00 ммоль) в THF (100 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором тартрата калия-натрия (20 мл) и MeOH (10 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и промывали с помощью THF (30 мл x 3). Органический слой выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-60% MeOH в воде (0,4% HCO₂H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 3-(2-фторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 83**, 0,49 г, 55,2%) в виде коричневого твердого вещества.

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6) δ 3,20 (2H, dt), 4,60 (2H, d), 4,90 (2H, dt), 5,41 (1H, t), 7,21 (1H, dd), 7,30 (1H, d), 7,68 (1H, d), 12,42 (1H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=223$.

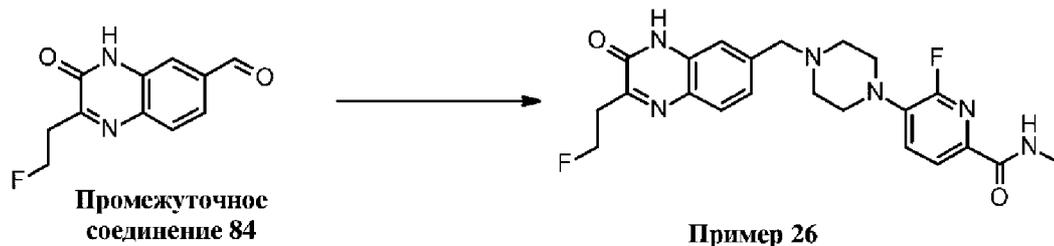
Промежуточное соединение 84. 2-(2-Фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегид

Периодат Десса-Мартина (229 мг, 0,54 ммоль) добавляли к 3-(2-фторэтил)-7-(гидроксиметил)хиноксалин-2(1H)-ону (**промежуточное соединение 83**, 100 мг, 0,45 ммоль) в DCM (3 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии, градиент элюирования 5-30% MeCN в воде (0,4% HCO $_2$ H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегида (**промежуточное соединение 84**, 93 мг, 94%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6) δ 3,20-3,28 (2H, m), 4,90 (2H, dt), 7,74-7,80 (2H, m), 7,91 (1H, d), 10,06 (1H, s), 12,66 (1H, s); масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=221$.

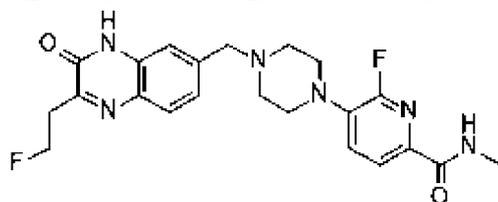
Пример 25 синтеза. 5-[4-[[2-(2-Фторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



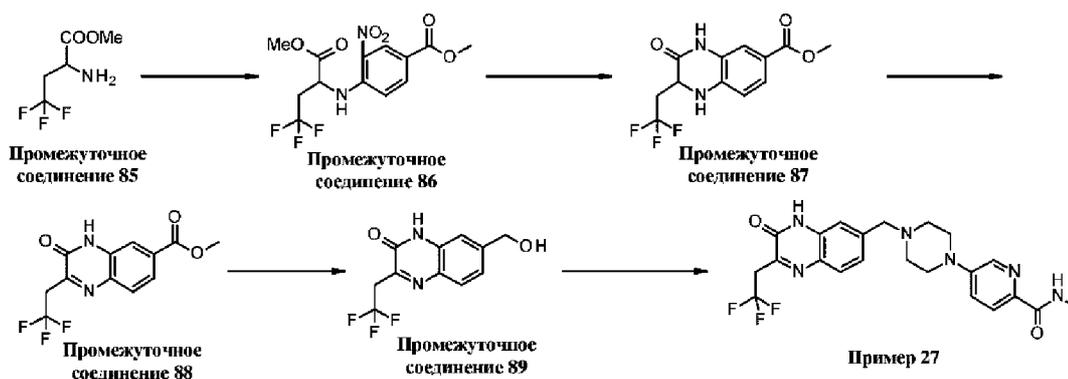
Изопропоксид титана (64,5 мг, 0,23 ммоль) добавляли к 2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегиду (**промежуточное соединение 84**, 50 мг, 0,23 ммоль) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 13**, 50,0 мг, 0,23 ммоль) в THF (3 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 минут. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (192 мг, 0,91 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Вышеуказанное повторяли с другой партией и две партии объединяли для осуществления очистки. Объединенную реакционную смесь очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 \times 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH $_4$ HCO $_3$), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 20 В до 35 В за 7 мин; 254/210 нм; RT: 6,38. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 5-[4-[[2-(2-фторэтил)-3-оксо-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида (**пример 25 синтеза**, 4,83 мг, 2,54%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 2,53-2,59 (4H, m), 2,78 (3H, d), 3,17 (1H, t), 3,23 (1H, t), 3,32-3,38 (4H, m), 3,63 (2H, s), 4,83 (1H, t), 4,95 (1H, t), 7,25-7,32 (2H, m), 7,39 (1H, dd), 7,71 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,26 (1H, d), 8,37 (1H, d), 12,36 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO- d_6) δ -217,70; масса/заряд (ES $^+$) $[\text{M}+\text{H}]^+=425$.



Пример 26 синтеза. 6-Фтор-5-[4-[[2-(2-фторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилтиридин-2-карбоксамид



Изопропоксид титана (90 мг, 0,32 ммоль) добавляли к 2-(2-фторэтил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбальдегиду (**промежуточное соединение 84**, 70 мг, 0,32 ммоль) и 6-фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 23**, 76 мг, 0,32 ммоль) в THF (3 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 минут. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (269 мг, 1,27 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (0,1 мл). Реакционную смесь выпаривали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC (колонка: XBridge Prep OBD C18, 30 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 28 В до 35 В за 8 мин; 254/210 нм; RT: 7. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт дополнительно очищали посредством препаративной HPLC (колонка: Xselect CSH OBD 30*150 мм, 5 мкм, n; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO₂H), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 5 В до 20 В за 7 мин; 254; 220 нм; RT: 6,83. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-фтор-5-[4-[[2-(2-фторэтил)-3-оксо-4Н-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**пример 26 синтеза**, 3,79 мг, 2,65%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,55-2,60 (4H, m), 2,76 (3H, d), 3,14-3,25 (6H, m), 3,63 (2H, s), 4,89 (2H, dt), 7,24-7,31 (2H, m), 7,57 (1H, dd), 7,70 (1H, d), 7,84 (1H, d), 8,24 (0,174H, s), 8,38 (1H, d), 12,37 (1H, s); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -72,51, -217,71; (ES⁺) [M+H]⁺=443.



Промежуточное соединение 86. Метил-3-нитро-4-(4,4,4-трифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-иламино)бензоат

DIPEA (8,77 мл, 50,22 ммоль) добавляли к метил-4-фтор-3-нитробензоату (2,0 г, 10,04 ммоль) и гидрохлориду метил-2-амино-4,4,4-трифторбутаноата (**промежуточное соединение 85**, 2,2 г, 10,55 ммоль) в DMF (20 мл). Полученную смесь перемешивали при 50°C в течение 10 часов. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и последовательно промывали насыщенным водным NH₄Cl (100 мл x 1) и соевым раствором (100 мл x 4). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали с получением требуемого продукта, метил-3-нитро-4-((4,4,4-трифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)бензоата (**промежуточное соединение 86**, 3,0 г, 85%), в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,99-3,28 (2H, m), 3,73 (3H, s), 3,84 (3H, s), 5,18 (1H, td), 7,28 (1H, d), 8,01 (1H, dd), 8,65 (1H, d), 8,71 (1H, d); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=351.

Промежуточное соединение 87. Метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилат

20% Pd(OH)₂/C (0,601 г, 0,86 ммоль) добавляли к метил-3-нитро-4-((4,4,4-трифтор-1-метокси-1-оксобутан-2-ил)амино)бензоату (**промежуточное соединение 86**, 3,0 г, 8,57 ммоль) в MeOH (300 мл) в атмосфере водорода. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит. Фильтрат выпаривали до сухого состояния с получением метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 87**, 2,3 г, 93%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,64-2,83 (2H, m), 3,76 (3H, s), 4,32-4,37 (1H, m), 6,78 (1H, d), 6,90 (1H, d), 7,37 (1H, d), 7,43 (1H, dd), 10,64 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=289.

Промежуточное соединение 88. Метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилат

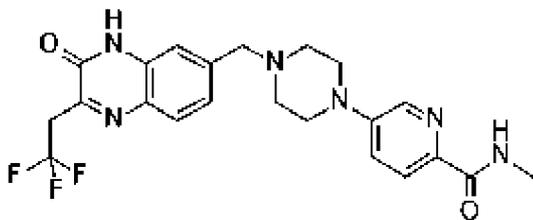
DDQ (1,975 г, 8,70 ммоль) добавляли к метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 87**, 2,28 г, 7,91 ммоль) в DCM (100 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную смесь удаляли при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Водн. насыщенный раствор NaHCO₃ (100

мл) добавляли к твердому веществу и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадок фильтровали и промывали дополнительным количеством водн. раствора NaHCO_3 (30 мл x 3). Твердое вещество высушивали под вакуумом с получением метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилата (**промежуточное соединение 88**, 2,2 г, 97%) в виде коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 3,88-3,98 (5H, m), 7,81 (1H, dd), 7,86-7,94 (2H, m), 12,75 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=287$.

Промежуточное соединение 89. 7-(Гидроксиметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-он

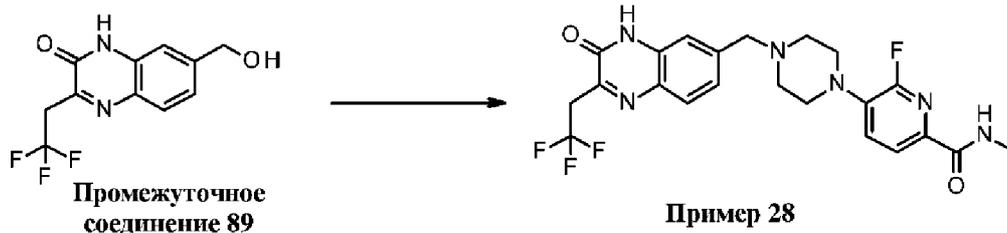
1 М раствор гидроксида диизобутилалюминия в THF (20,96 мл, 20,96 ммоль) частями добавляли к метил-3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-3,4-дигидрохиноксалин-6-карбоксилату (**промежуточное соединение 88**, 1,0 г, 3,49 ммоль) в THF (100 мл) при 0°C . Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором тартрата калия-натрия (20 мл) и MeOH (10 мл) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и промывали с помощью THF (30 мл x 3). Органический слой выпаривали с получением грязно-белого твердого вещества, которое очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 5-55% MeOH в воде (0,4% HCO_2H). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением 7-(гидроксиметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 89**, 650 мг, 72,2%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 3,88 (2 H, q), 4,62 (2H, d), 5,45 (1H, t), 7,24 (1H, dd), 7,33 (1H, d), 7,73 (1H, d), 12,62 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=259$.

Пример 27 синтеза. N-Метил-5-[4-[[3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид

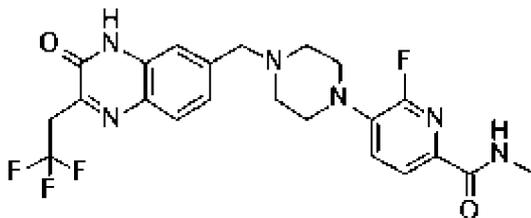


7-(Гидроксиметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 89**, 50 мг, 0,19 ммоль) добавляли к 33% HBr в AcOH (2 мл, 12,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Реакционную смесь выпаривали под вакуумом с получением 7-(бромметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-она (неочищенный продукт). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. DiPEA (0,169 мл, 0,97 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-ону (неочищенный продукт) и N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 13**, 50 мг, 0,23 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали, очищали посредством

препаративной HPLC (колонка: Sunfire Prep C18, 30×150, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO₂H), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 10 В до 25 В за 7 мин; 254/220 нм; RT: 6,57. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида (**пример 27 синтеза**, 41,5 мг, 46,6%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,56 (4H, m), 2,78 (3H, d), 3,35 (4H, m), 3,65 (2H, s), 3,88 (2H, q), 7,29-7,42 (3H, m), 7,79 (2H, m), 8,25-8,30 (1H, m), 8,38 (1H, m), 12,60 (1H, br s); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -61,53; масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=461.



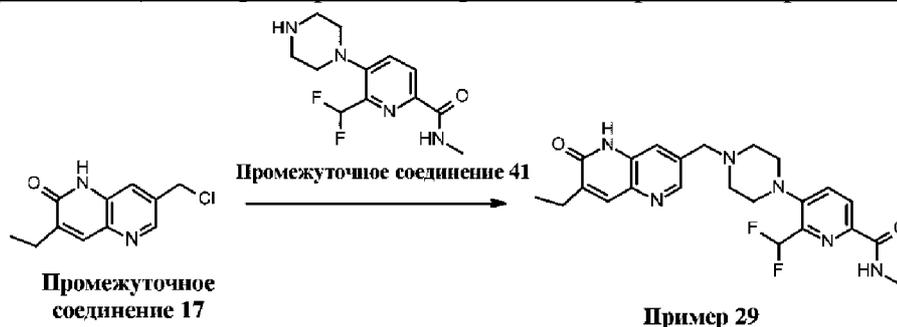
Пример 28 синтеза. 6-Фтор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид



7-(Гидроксиметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-он (**промежуточное соединение 89**, 60 мг, 0,23 ммоль) добавляли к 33% HBr в AcOH (2 мл, 12,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Реакционную смесь выпаривали под вакуумом с получением 7-(бромметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-она (неочищенный продукт). Продукт непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. DIPEA (0,203 мл, 1,16 ммоль) добавляли к 7-(бромметил)-3-(2,2,2-трифторэтил)хиноксалин-2(1H)-ону (неочищенный продукт) и 6-фтор-N-метил-5-(пиперазин-1-ил)пиколинамиду (**промежуточное соединение 23**, 60 мг, 0,25 ммоль) в NMP (2 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Полученную смесь очищали посредством препаративной HPLC (колонка: Sunfire Prep C18, 30×150, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (0,1% HCO₂H), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 12 В до 30 В за 7 мин; 254/220 нм; RT: 6,25. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали до сухого состояния с получением 6-фтор-N-метил-5-[4-[[3-оксо-2-(2,2,2-трифторэтил)-4H-хиноксалин-6-ил]метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамида (**пример 28 синтеза**, 49,0 мг, 43,3%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,53-2,63 (4H, m), 2,76 (3H, d), 3,15-3,22 (4H, m), 3,65 (2H, s), 3,88 (2H, q), 7,28-7,35 (2H, m), 7,57 (1H, dd), 7,76 (1H, d), 7,84 (1H, dd),

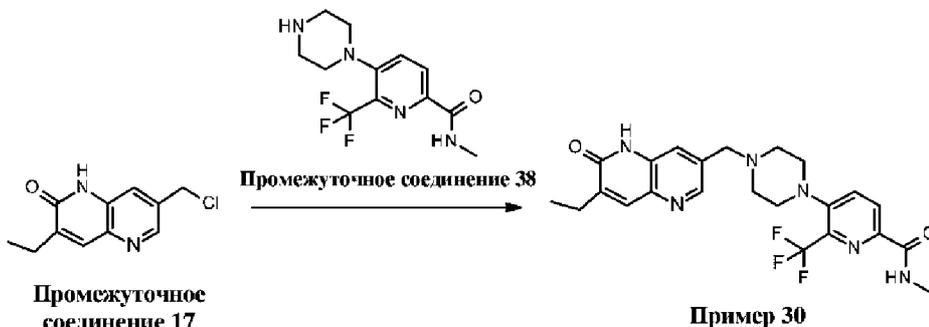
8,17 (0,185H, s), 8,38 (1H, m), 12,57 (1H, s); ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ -61,54, -72,52; масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=479$.

Пример 29 синтеза. 6-(Дифторметил)-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксаимид



DIPEA (330 мкл, 1,89 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(хлорметил)-3-этил-1,5-нафтиридин-2(1H)-она, HCl (**промежуточное соединение 17**, 70 мг, 0,27 ммоль), йодида натрия (4,05 мг, 0,03 ммоль) и 6-(дифторметил)-N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 41**, 102 мг, 0,30 ммоль) в ацетонитриле (2,4 мл) при 20°C и полученный раствор перемешивали при 50°C в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, и добавляли 50 мл воды, и затем 3 мл насыщ. NaHCO_3 . Смесь экстрагировали этилацетатом. После концентрирования полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-30% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением 6-(дифторметил)-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамида (**пример 29 синтеза**, 52,0 мг, 42%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (500МГц, DMSO-d_6) 1,19 (3H, t), 2,54-2,58 (2H, m), 2,63 (4H, br s), 2,84 (3H, d), 3,03 (4H, br t), 3,68 (2H, s), 7,14 (1H, t), 7,62 (1H, d), 7,76 (1H, s), 7,86 (1H, d), 8,10 (1H, d), 8,32-8,45 (2H, m), 11,86 (1H, s); масса/заряд (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+=457$.

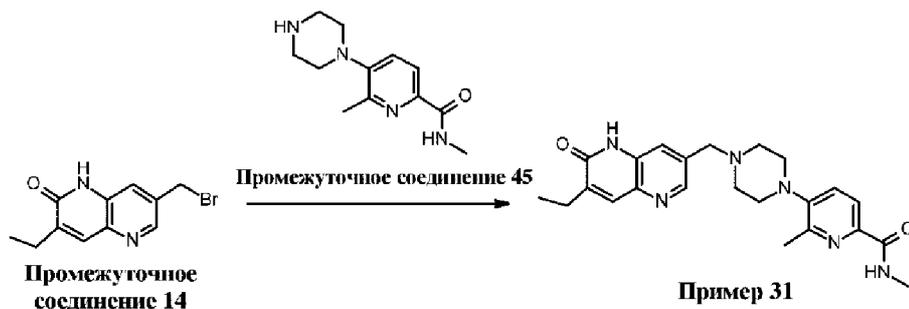
Пример 30 синтеза. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксаимид



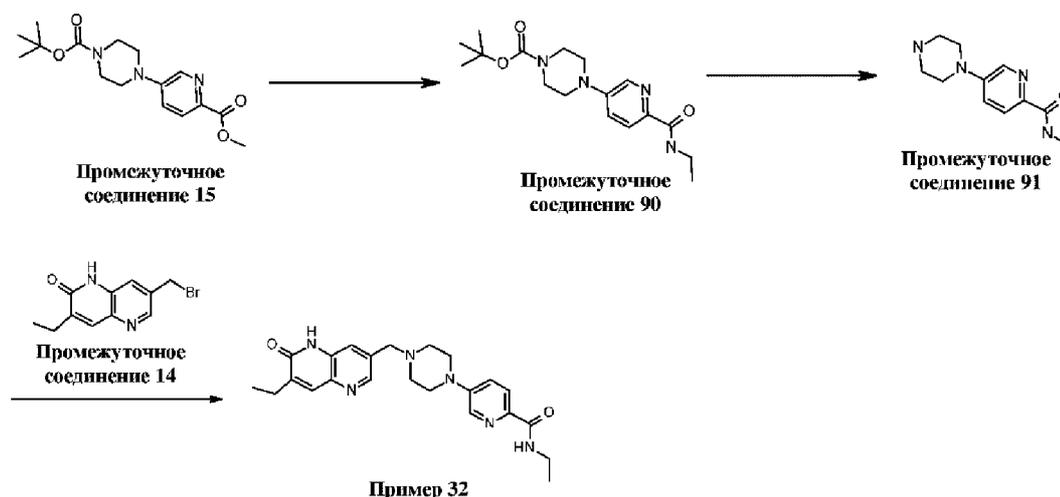
DIPEA (330 мкл, 1,89 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(хлорметил)-3-этил-1,5-нафтиридин-2(1H)-она, HCl (**промежуточное соединение 17**, 70

мг, 0,27 ммоль), йодида натрия (4,05 мг, 0,03 ммоль) и N-метил-5-пиперазин-1-ил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 38**, 107 мг, 0,30 ммоль) в ацетонитриле (2,4 мл) при 20°C и полученный раствор перемешивали при 50°C в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, и добавляли 50 мл воды, и затем 3 мл насыщ. NaHCO₃. Смесь экстрагировали этилацетатом. После концентрирования полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-30% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (**пример 30 синтеза**, 58,0 мг, 45%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,19 (3H, t), 2,54-2,62 (6H, m), 2,83 (3H, d), 3,04 (4H, br t), 3,67 (2H, s), 7,62 (1H, d), 7,75 (1H, s), 8,04 (1H, d), 8,19 (1H, d), 8,31-8,48 (2H, m), 11,85 (1H, s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=475.

Пример 31 синтеза. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамид



DIPEA (0,366 мл, 2,10 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1,5-нафтиридин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 14**, 80 мг, 0,30 ммоль) и N,6-диметил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 45**, 101 мг, 0,33 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C и полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, и добавляли 50 мл воды, и затем добавляли 3 мл насыщ. NaHCO₃. Смесь экстрагировали этилацетатом. После концентрирования полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования 0-30% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении до сухого состояния с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N,6-диметилпиридин-2-карбоксамида (**пример 31 синтеза**, 36,0 мг, 29%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,19 (3H, t), 2,50 (3H, s), 2,54-2,57 (2H, m), 2,57-2,64 (4H, m), 2,81 (3H, d), 2,96 (4H, br s), 3,68 (2H, s), 7,49 (1H, d), 7,63 (1H, d), 7,76 (1H, s), 7,80 (1H, d), 8,35-8,47 (2H, m), 11,85 (1H, br s); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=421.



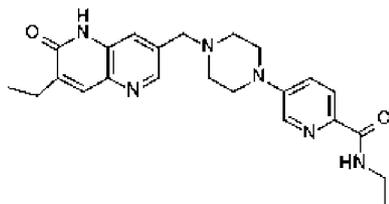
Промежуточное соединение 90. трет-Бутил-4-[6-(этилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилат

Этанамин в метаноле (7 М, 7,78 мл, 15,56 ммоль) добавляли к раствору трет-бутил-4-(6-(метоксикарбонил)пиридин-3-ил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 15**, 500 мг, 1,56 ммоль) и полученный раствор перемешивали при 50°C в течение 18 часов. Растворитель удаляли под вакуумом и образец дополнительно высушивали с получением трет-бутил-4-[6-(этилкарбамоил)-3-пиридил]пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 90**, 0,495 г, 95%). ¹H ЯМР (500МГц, DMSO-d₆) 1,11 (3H, t), 1,43 (9H, s), 3,27-3,32 (6H, m), 3,44-3,52 (4H, m), 7,42 (1H, dd), 7,85 (1H, d), 8,28 (1H, d), 8,44 (1H, br t).

Промежуточное соединение 91. N-Этил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида

HCl в диоксане (0,473 мл, 15,58 ммоль) медленно добавляли к перемешиваемому раствору трет-бутил-4-(6-(этилкарбамоил)пиридин-3-ил)пиперазин-1-карбоксилата (**промежуточное соединение 90**, 521 мг, 1,56 ммоль) в метаноле (10 мл). Полученный раствор перемешивали при к. т. в течение 17 часов. Реакционную смесь концентрировали и твердое вещество высушивали с получением N-этил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное соединение 91**, 421 мг, 88%); масса/заряд (ES⁺) [M+H]⁺=235

Пример 32 синтеза. N-Этил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]тиридин-2-карбоксамида



DIPEA (0,320 мл, 1,83 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(бромметил)-3-этил-1,5-нафтиридин-2(1H)-она (**промежуточное соединение 14**, 70 мг, 0,26 ммоль) и N-этил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамида, 2HCl (**промежуточное**

соединение 91, 89 мг, 0,29 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) при 20°C и полученный раствор перемешивали при 70°C в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, и добавляли 50 мл воды, и затем добавляли 3 мл насыщ. NaHCO₃. Смесь экстрагировали этилацетатом. После концентрирования неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой хроматографии (колонка: XbridC18), градиент элюирования 20-50% MeCN в воде (с 0,2% NH₄OH). Чистые фракции выпаривали до сухого состояния с получением N-этил-5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]пиридин-2-карбоксамид (**пример 32 синтеза**, 28,0 мг, 25%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,10 (3H, t), 1,19 (3H, t), 2,52-2,55 (2H, m), 2,55-2,59 (4H, m), 3,26-3,30 (2H, m), 3,34 (4H, br d), 3,66 (2H, s), 7,40 (1H, dd), 7,63 (1H, s), 7,76 (1H, s), 7,83 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,36-8,46 (2H, m), 11,74-11,94 (1H, m); масса/заряд (ES⁺) [M]⁺=420.

Пример 4 синтеза - форма А

В примере 4 синтеза 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид получали в виде частично кристаллического твердого вещества посредством выпаривания раствора метанола/дихлорметана при пониженном давлении. Кристаллический материал, полученный таким образом, характеризовали как кристаллическую форму А.

В случае низкой степени кристалличности кристаллическую форму А можно было получить посредством суспендирования 20 мг неочищенного образца в 0,20 мл воды, метанола, этанола, ацетона, ацетонитрила, тетрагидрофурана, этилацетата или другого растворителя в течение 1 дня при температуре окружающей среды или 50°C.

Форму А анализировали посредством XRPD и результаты показаны на фигуре 16А и сведены в таблицу ниже.

Пики XRPD для формы А

Угол (2θ ± 0,2°)	Интенсивность (%)
8,3	100,0
12,4	30,9
19,4	26,5
20,4	25,8
26,3	19,2
21,2	17,4
20,8	14,8
22,8	14,1
16,8	14,0
10,2	13,2
18,4	10,8

11,4	9,9
28,1	8,4
18,0	8,4
25,2	8,2
24,9	6,7
16,5	6,4
17,3	5,3
22,1	4,0
29,3	3,3
24,3	2,7
30,3	2,5
38,2	2,0
33,9	1,4
14,2	1,4
13,7	1,4
33,0	1,3
36,5	1,2
39,2	1,2

Форма А характеризуется тем, что обеспечивает по меньшей мере одно из следующих значений угла 2θ , измеренных с применением $\text{CuK}\alpha$ -излучения: 8,3, 12,4 и 19,4°.

Форму А анализировали с помощью методик термического анализа. Результаты DSC-анализа указывали на то, что форма А характеризуется точкой плавления с началом при 254°C и пиком при 255°C. Репрезентативная кривая DSC для формы А показана на фигуре 16В.

Биологические анализы (селективный ингибитор PARP1)

Следующие процедуры тестирования можно применять для определения ингибирующих свойств описанных в данном документе соединений, представляющих собой селективные ингибиторы PARP1.

Анализы связывания PARP на основе анизотропии флуоресценции

Рекомбинантный полноразмерный белок PARP1 с меткой 6HIS разбавляли до 6 нМ с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl и инкубировали в течение четырех часов с эквивалентным объемом 2 нМ флуоресцентного зонда, разбавленного с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl. Конечную концентрацию DMSO в растворе зонда поддерживали ниже 1% (об/об).

Рекомбинантный полноразмерный белок PARP2 разбавляли до 6 нМ с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl и инкубировали в течение четырех часов с эквивалентным объемом 2 нМ флуоресцентного зонда, разбавленного с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl. Конечную концентрацию DMSO в растворе зонда поддерживали ниже 1% (об/об).

Рекомбинантный полноразмерный белок PARP3 разбавляли до 100 нМ с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl и инкубировали в течение четырех часов с эквивалентным объемом 6 нМ флуоресцентного зонда, разбавленного с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl. Конечную концентрацию DMSO в растворе зонда поддерживали ниже 1% (об/об).

Рекомбинантный связывающий домен PARP5a разбавляли до 160 нМ с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl и инкубировали в течение четырех часов с эквивалентным объемом 6 нМ флуоресцентного зонда, разбавленного с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl. Конечную концентрацию DMSO в растворе зонда поддерживали ниже 1% (об/об).

Рекомбинантный полноразмерный белок PARP6 с меткой GST разбавляли до 160 нМ с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl и инкубировали в течение четырех часов с эквивалентным объемом 6 нМ флуоресцентного зонда, разбавленного с помощью 50 мМ Tris, pH 8, 0,001% Triton X100, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl. Конечную концентрацию DMSO в растворе зонда поддерживали ниже 1% (об/об).

Флуоресцентную анизотропию зонда при связывании с белками измеряли с применением BMG Pherastar FS[®] в присутствии тестируемых соединений или контроля с растворителем и определяли влияние на анизотропию. Рассчитывали процентные значения ингибирования для различных концентраций тестируемого соединения и аппроксимировали относительно четырехпараметрического логистического графика с целью определения значения IC₅₀. При необходимости K_i соединения можно определить на основе значения IC₅₀ с применением уравнения Мансона-Родбарда, определение которого представлено в Anal Biochem. 1980 Sep 1;107(1):220-39, и на основе известной K_D зонда, связывающегося с соответствующим белком PARP.

Электрофизиологический анализ hERG

Электрофизиологические показатели (все выполняли при к. т.) стабильно трансфицированных клеток CHO hKv11.1 получали с применением Nanion Syncropatch 768PE. К тестируемым соединениям, контролям со средой-носителем или положительным контролям добавляли 6 планшетов с соединениями, каждый с отличной концентрацией, для нанесения на клетки кумулятивных доз (10 мМ, 3,167 мМ, 1 мМ, 0,3167 мМ, 0,1 мМ, 0,03167 мМ). 600 мкл соединения ресуспендировали в 90 мкл эталонного буфера (в мМ, 80 NaCl, 4 KCL, 5 CaCl, 1 MgCl, 60 NMDG Cl, 5 моногидрата D-глюкозы, 10 HEPES (pH 7,4 HCL, 298 мосм) для получения конечной концентрации

соединения, составляющей 39,6 мкМ, 13,2 мкМ, 4,4 мкМ, 1,46 мкМ, 0,48 мкМ, 0,16 мкМ. Для каждого цикла Nanion SyncroPatch 768PE измеряли амплитуду тока в каждой клетке в присутствии внеклеточного раствора (в мМ, 80 NaCl, 4 KCl, 5 CaCl, 1 MgCl, 60 NMDG Cl, 5 моногидрата D-глюкозы, 10 HEPES (pH 7,4 HCL, 298 мосм), при этом добавление жидкостей осуществляли с применением системы дозирования жидкостей SyncroPatch. Добавляли 40 мкл внешнего раствора (в мМ, HBPS, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ (pH 7,4, NaOH) в 384-луночный многоканальный чип для регистрации со средним сопротивлением и заливали внутренний буфер (в мМ, 130 KF, 20 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 25 эсцина (все от Sigma-Aldrich; pH 7,2-7,30 с применением 10 M KOH, 320 мосм) в нижнюю часть планшета. Вносили 20 мкл клеток при плотности 1е6 клеток/мл при поддержании температуры ~9°C в каждую лунку чипа, затем вносили 20 мкл усилителя контакта (в мМ, 80 NaCl, 3 KCl, 10 CaCl, 10 HEPES, 1 MgCl (pH 7,4 NaOH). Осуществляли стадию промывки, при этом оставляли остаточный объем, составляющий 40 мкл. Вносили 40 мкл эталонного буфера для установления стабильного исходного уровня перед добавлением тестируемого соединения, при этом осуществляли стадию удаления 40 мкл через 3 мин, повторяли указанную стадию. Вносили 40 мкл соединения в концентрации 1 (0,16 мкМ), осуществляли регистрацию в режиме “реального времени” для воздействия в течение 3 мин перед удалением 40 мкл. Указанную стадию повторяли для 5 дополнительных последующих планшетов с соединением для проведения анализа кумулятивной кривой. Все данные подвергали вычитанию утечки, 2 импульса до -80 мВ 100 мс при времени задержки 100 мс. Затем вызывали выходящие токи K⁺ посредством перепада напряжения от исходного потенциала, составлявшего -90 мВ, до +60 мВ, каждый импульс доставляли с частотой 2 Гц при интервале между импульсами, равном 15 с.

Анализ пролиферации с применением PARP (введение дозы соединения в течение 4 дней)

Клетки DLD1 и BRCA2 (-/-) DLD1 собирали с получением плотности 1,875E4 клеток/мл и 6,25E4 клеток/мл, соответственно, в полной среде, высевали при 40 мкл/лунка в 384-луночные планшеты (Greiner, Кремс-мюнстер, Австрия; 781090) с применением Multidrop Combi, затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день (день 1) с применением Multidrop Combi добавляли SYTOX зеленый (5 мкл, 2 мкМ) и сапонин (10 мкл, 0,25% исходный раствор) в планшет дня 0, герметично закрывали планшет с помощью черной клейкой крышки и инкубировали в течение >3 ч при к. т. Клетки визуализировали с применением Cell Insight (Thermo Fisher), оснащенного объективом 4x. Тестируемые соединения добавляли с применением Echo 555 и помещали в инкубатор с поддержанием 37°C, 5% CO₂ и инкубировали в течение 4 дней. В день 5 добавляли SYTOX зеленый (5 мкл, 2 мкМ) и затем сапонин (10 мкл, 0,25% исходный раствор) в планшеты, герметично закрывали планшет с помощью черной клейкой крышки и инкубировали в течение >3 ч при к. т. Клетки считывали с помощью Cell Insight с объективом 4x. Скорость пролиферации

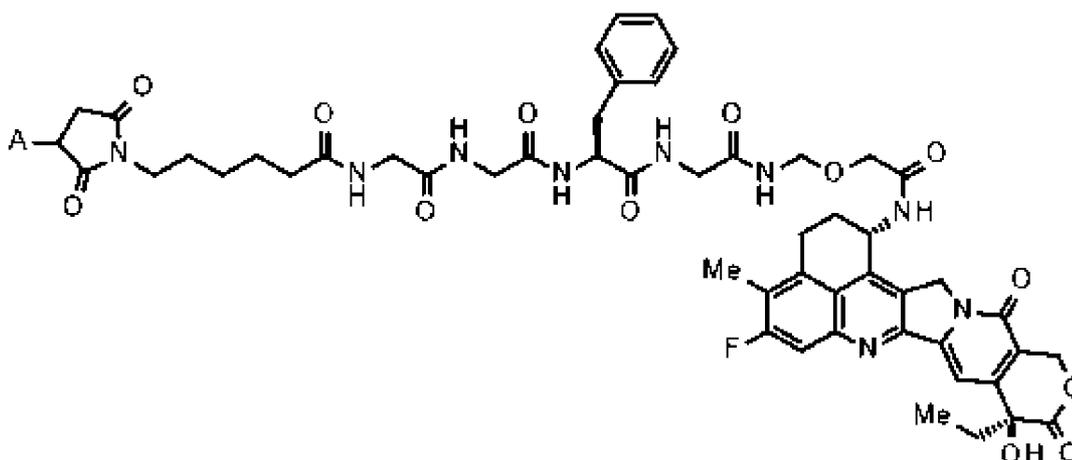
определяют в Genedata посредством оценки общего количества клеток, полученного с помощью Cell Insight для планшетов дня 0 и дня 5.

№ синтетич. примера	PARP1, IC50 (мкМ)	PARP2, IC50 (мкМ)	PARP3, IC50 (мкМ)	PARP5a, IC50 (мкМ)	PARP6, IC50 (мкМ)	Пролиф. 4 д. BRCA2 -/- DLD-1, IC50 (мкМ)	Пролиф. 4 д. WT DLD-1, IC50 (мкМ)	hERG, IC50 (мкМ)
1	0,003	1,7	4	>100	34	0,010	>30	>40
2	0,004	0,88	9,9	20	14	0,008	>30	>40
3	0,005	1,3	12	>100	14	0,004	>30	22
4	0,004	>1,5	4,7	>100	19	>0,017	>30	>40
5	0,002	0,65	7,1	>100	23	0,006	>30	>40
6	0,003	0,84	9,3	>100	8,2	0,006	>30	>40
7	0,002	1,3	2,6	94	22	4,14		
8	0,003	11	55	93	18	0,011	>19	>40
9	0,009	22	>100	>100	47	0,010	17	>40
10	0,005	17	48	56	26	0,006	>30	>40
11	0,005	4	13	>100	22	0,184	>30	>40
12	0,004	1,6	19	89	11	0,008	>30	>40
13	0,007	8,5	30	>100	30	0,005	>26	>40
14	0,004	2,9	30	50	11	0,006	>30	>40
15	0,011	3,6	35	>100	80	0,090	>30	>40
16	0,007	3,3	74	61	31	0,018	>22	>40
17	0,007	1,7	96	>100	59	0,020	>30	>40
18	0,031	17	>100	>100	>29	4,90	>30	5,2
19	0,015	>100	>100	>100	>29	0,015	>30	21
20	0,014	28	>100	>100	>100	0,016	>24	38
21	0,004	9,5	>100	>100	33	0,016	>30	>40
22	0,006	1	2,6	26	16	0,012	>30	>40
23	0,004	4,4	60	60	>100		4,2	36
24	0,003	5,1	>100	93	>100	0,010	14	37
25	0,002	6	43	>100	>100		>25	>40
26	0,005	6,7	>100	>100	>100	0,005	23	>40

27	0,007	16	>100	71	>100	10,3	>10	26
28	0,006	14	>100	>29	>100	0,027	>30	>40
29	0,004	6,1	9,9	>100	14	0,007	>30	>40
30	0,003	7,6	4,5	>100	10	0,004	>30	>40
31	0,005	3,7	2,6	>100	28			>40
32	0,003	2,1	1,9	>100	10			>40

Пример 1. Получение конъюгата антитела и лекарственного средства

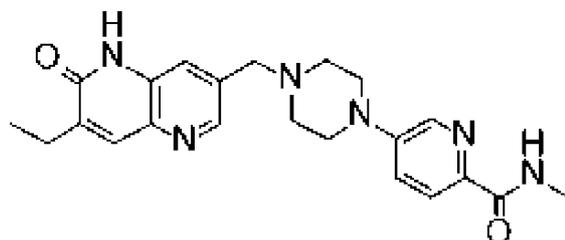
В соответствии со способом получения, описанным в WO 2015/115091, и с применением антитела к HER2 (антитела, содержащего тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (аминокислотные остатки 1-449 из SEQ ID NO: 1), и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из всех аминокислотных остатков 1-214 из SEQ ID NO: 2) получали конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственное средство-линкер, представленный следующей формулой:



где А представляет собой положение присоединения к антителу, конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи (DS-8201: трастузумаб дерукстекан). DAR конъюгата антитела и лекарственного средства составляет 7,7 или 7,8.

Пример 2. Получение селективного ингибитора PARP1

В соответствии со способом получения, описанным в данном документе, получали селективный ингибитор PARP1 формулы (I). В частности 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид:



(AZD5305),

может быть получен в соответствии с примером 4 синтеза в данном документе (пример 4 из WO2021/013735).

Пример 3. Тестирование противоопухолевого эффекта

Комбинация конъюгата антитела и лекарственного средства DS-8201 (трастузумаб дерукстекан (Enhertu[®])) с селективным ингибитором PARP1 AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамид).

Способ

Проводили высокопродуктивный скрининг комбинаций, в котором 27 линий клеток рака молочной железы с разной экспрессией HER2 и одну линию клеток желудка с высокой экспрессией HER2 (таблица 1) обрабатывали комбинациями DS-8201 и AZD5305 (селективный ингибитор PARP1).

Таблица 1

Клеточная линия	Статус HER2	Тип рака
NCI-N87	Амп. (высокий)	Желудка
SKBR3	Амп. (высокий)	Молочной железы
AU565	Амп. (высокий)	Молочной железы
HCC1569	Амп. (высокий)	Молочной железы
HCC1187	Низкая	Молочной железы
HCC1954	Амп. (высокий)	Молочной железы
KPL-4	Амп. (высокий)	Молочной железы
HCC38	Амп. (низкий)	Молочной железы
MCF7 (ER+)	Дел. (нулевой)	Молочной железы
MDA-MB-157	Низкая	Молочной железы
HCC1419	Амп. (высокий)	Молочной железы
ZR-75-30	Амп. (высокий)	Молочной железы
ZR-75-1 (ER+)	Низкая	Молочной железы
HCC1395	Низкая	Молочной железы
BT474 (ER+)	Амп. (высокий)	Молочной железы
EFM-19 (ER+)	Низкая	Молочной железы
HCC1937	нуль	Молочной железы
BT-549	Дел. (нулевой)	Молочной железы
MDA-MB-453	Низкая	Молочной железы
MDA-MB-361	Амп. (низкий)	Молочной железы
CAL-51	Низкая	Молочной железы
MDA-MB-468	Амп. (низкий)	Молочной железы

T-47D (ER+)	Низкая	Молочной железы
HCC1143	Низкая	Молочной железы
JIMT1	Амп. (низкий)	Молочной железы
CAMA1 (ER+)	Низкая	Молочной железы
MDA-MB-231	Низкая	Молочной железы
HCC70	Низкая	Молочной железы

Показания скрининга представляли собой 7-дневный клеточный анализ жизнеспособности клеток Titer-Glo, проводимый в виде матрицы 6×6 доза-ответ (логарифмическое серийное разведение с 5 точками для DS-8201 и полулогарифмическое серийное разведение для AZD5305). Максимальная концентрация представляла собой 3 мкМ для AZD5305 и 10 мкг/мл для DS-8201. Кроме того, трастузумаб и эксатекан (ингибитор ДНК-топоизомеразы I) также подвергали скринингу одновременно с AZD5305, чтобы помочь раскрыть механизм действия эффективных комбинаций. Активность комбинации оценивали на основе комбинации ΔEmax и баллов синергии согласно Loewe.

Результаты

Результаты показаны для клеточных линий с высоким уровнем HER2 (KPL4, NCI-N87, SKBR3, HCC1954, HCC1569, AU565) на фигурах 12A и 12B и в таблице 2, а также для клеточных линий с низким уровнем HER2 (MDA-MB-468, MDA-MB-157, HCC1187, T47D, HCC38) на фигурах 13A и 13B и в таблице 3.

На фигурах 12A и 13A показаны матрицы измеренных сигналов жизнеспособности клеток. Ось X представляет собой лекарственное средство А (DS-8201), а ось Y представляет собой лекарственное средство В (AZD5305). Значения в рамке представляют собой соотношение клеток, обработанных лекарственными средствами А и В, по сравнению с контролем с DMSO в день 7. Все значения нормализованы относительно значений жизнеспособности клеток в день 0. Значения от 0 до 100 представляют собой подавление роста в %, а значения выше 100 представляют собой гибель клеток.

На фигурах 12B и 13B показаны матрицы избытка согласно Loewe. Значения в рамке представляют собой значения избытка, рассчитанные с помощью модели аддитивности согласно Loewe.

В таблицах 2 и 3 показаны баллы синергии согласно HSA и баллы аддитивности согласно Loewe.

Таблица 2

Клеточная линия	KPL4	NCI-N87	SKBR3	HCC1954	HCC1569	AU565
Балл синергии согласно HSA	68,2	70,95	20,33	9,9	38,6	32,77

Балл синергии согласно Loewe	68,2	70,95	20,33	9,9	38,6	32,77
------------------------------	------	-------	-------	-----	------	-------

Таблица 3

Клеточная линия	MDA-MB-468	MDA-MB-157	HCC1187	T47D	HCC38
Балл синергии согласно HSA	11,6	7,04	52,7	12,33	8,9
Балл синергии согласно Loewe	11,6	6,5	52,7	12,33	8,8

Примечания.

Аддитивность доз согласно Loewe предполагает ответ, если два соединения воздействуют на одну и ту же молекулярную мишень с помощью одного и того же механизма. С помощью нее рассчитывают аддитивность, предполагая нулевые взаимодействия между соединениями, и она является независимой от природы взаимосвязи доза-ответ.

HSA (наилучшее отдельное средство) [Berenbaum 1989] количественно рассчитывают согласно наилучшим из двух эффектов отдельных соединений при их соответствующих концентрациях. Комбинированный эффект сравнивают с эффектом каждого отдельного средства при концентрации, применяемой в комбинации. Избыточный эффект выше значения наилучшего отдельного средства указывает на кооперативность. HSA не требует влияния соединений на одну и ту же мишень.

Матрица избытка. Для каждой лунки в матрице концентраций измеренные или аппроксимированные значения сравнивают с прогнозируемыми значениями при отсутствии синергии для каждой пары концентраций. Прогнозируемые значения определяют с помощью выбранной модели. Отличия между прогнозируемыми и наблюдаемыми значениями могут указывать на синергию или антагонизм и показаны в матрице избытка. Значения в матрице избытка обобщенно представлены в виде комбинации баллов избыточного объема и балла синергии.

На фигуре 14 показаны значение E_{max} и баллы синергии согласно Loewe в различных клеточных линиях, обработанных DS-8201 в комбинации с AZD5305.

Как видно из фигур 12A и 12B, а также из таблицы 2, AZD5305 синергетически взаимодействует с DS-8201, а также увеличивает степень гибели клеток в HER2+ клеточных линиях молочной железы и желудка. Как видно из фигур 13A и 13B, а также из таблицы 3, AZD5305 синергетически взаимодействует с DS-8201, а также увеличивает степень гибели клеток в клеточных линиях рака молочной железы с низким уровнем HER2 при E_{max} (3 мкМ AZD5305 и 10 мкг/мл DS-8201). Как видно из Фигуры 14, в одиннадцати клеточных линиях, включая клеточные линии рака молочной железы с низким уровнем HER2, обработка с помощью DS-8201 в комбинации с AZD5305 приводила к высокой E_{max} комбинации (>100) и высоким баллам синергии согласно

Loewe (>5).

Пример 4. Тестирование противоопухолевого эффекта

Комбинация конъюгата антитела и лекарственного средства DS-8201 (трастузумаб дерукстекан (Enhertu[®])) с селективным ингибитором PARP1 AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамид).

Способ

Клетки, выращенные в соответствующих условиях, высевали в 96-луночные планшеты при оптимальной плотности с обеспечением линейной пролиферации на протяжении всего анализа (от 4 до 8 дней). Непосредственно после высевания в клетки вводили дозу указанных соединений в общем объеме 200 мкл/луночка и помещали в инкубатор. Комбинирование проводили в виде матрицы 6×8 концентрация-ответ для каждой комбинации. В конце исследования клетки фиксировали в 2% PFA в течение 20 минут при комнатной температуре. С целью получения количества клеток в начале обработки для каждого эксперимента применяли один дополнительный планшет и фиксировали после прикрепления клеток. Затем клетки пермеабилizировали в 0,5% Triton-X100 в PBS в течение 10 минут. После промывки с помощью PBS клетки блокировали в 5% FBS в PBS 1 ч при к. т. и инкубировали с первичными антителами в 5% FBS+0,05% Triton в течение ночи при 4°C. После 3 промывок в PBS клетки инкубировали с вторичными антителами в 5% FBS+0,05% Triton с Hoechst33258 в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3 промывок в PBS клетки сканировали с помощью прибора Cellinsight с использованием объектива 10x и 9 полей/луночка. Изображения анализировали с применением Columbus для подсчета клеток на основе окрашивания ядра с помощью Hoechst. Общее количество клеток/луночка применяли для расчета относительного роста в каждой луночке по сравнению с контролем с растворителем. Для расчета баллов синергии данные подавления роста анализировали с использованием программного обеспечения Combeneft (Di Veroli, G.Y., et al., Combeneft: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, 2016, **32**(18): p. 2866-8).

Результаты

Результаты показаны для клеточной линии с высоким уровнем HER2 (KPL4) и двух клеточных линий с низким уровнем HER2 (JIMT1, MDA-MB-468) на фигурах 15A и 15B.

На фигуре 15A показаны матрицы количества клеток, в которых оси Y представляют лекарство А (DS-8201), а оси X представляют лекарство В (AZD5305). Значения в рамке представляют собой относительные общие количества клеток (ядерных) в процентах от контроля со средой-носителем DMSO.

На фигуре 15B показаны матрицы, в которых оси Y представляют лекарство А (DS-8201), а оси X представляют лекарство В (AZD5305), а значения в рамке представляют собой рассчитанные баллы синергии согласно Loewe.

Результаты в примерах 3 и 4 демонстрирует, что селективное подавление PARP1 с применением AZD5305 усиливает противоопухолевую эффективность DS-8201 в клеточных линиях как с низкой, так и с высокой экспрессией HER2 *in vitro*. В примере 3 AZD5305 в комбинации с DS-8201 продемонстрировал преимущество комбинации в пяти клеточных линиях рака HER2+ молочной железы, одной клеточной линии рака HER2+ желудка (фигуры 12A, 12B, 14 и таблица 2) и пяти клеточных линиях рака молочной железы с низким уровнем HER2 (фигуры 13A, 13B и 14 и таблица 3). В примере 4 AZD5305 в комбинации с DS-8201 показал синергетическую активность в клеточных линиях с высоким уровнем HER2 (KPL4) и низким уровнем HER2 (JIMT-1, MDA-MB-468) (фигуры 15A и 15B).

Пример 5. Тестирование противоопухолевого эффекта - *in vivo*

Комбинация конъюгата антитела и лекарственного средства DS-8201 (трастузумаб дерукстекан (Enhertu[®])) с селективным ингибитором PARP1 AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метил-пиридин-2-карбоксамид).

Способ

Использовали самок "голых" мышей (Charles River) возрастом 5-8 недель, через 7 дней привыкания перед вхождением в исследование. 1×10^7 опухолевых клеток NCI-N87 (1:1 в Matrigel) имплантировали подкожно в бок самок "голых" мышей. Когда размер опухоли достигал примерно 150 мм^3 , опухоли подобного размера произвольным образом распределяли на группы обработки, как показано в таблице 4.

Таблица 4

Обработка	Доза	Путь введения	Режим дозирования (28 дней)
Среда-носитель	----	IV+PO	Однократная доза+QD
DS-8201	3 мг/кг	IV	Однократная доза
DS-8201	1 мг/кг	IV	Однократная доза
AZD5305	1 мг/кг	PO	QD
DS-8201+AZD5305	1 мг/кг или 3 мг/кг+1 мг/кг	IV+PO	Однократная доза+QD

PO: пероральное (per os) введение дозы

QD: введение дозы один раз в день (quaque die)

Дозу соединения для каждого животного рассчитывали на основе веса тела индивидуума в день введения доз. DS-8201 и AZD5305 вводили в тот же день, при этом DS-8201 вводили примерно через 1 час после PO дозы AZD5305. DS-8201 вводили в виде однократной дозы при 1 мг/кг или 3 мг/кг в день 1, а AZD5305 вводили при 1 мг/кг QD в течение 28 дней. Продолжительность введения доз составляла 28 дней.

Составление DS-8201 при 3 мг/кг и 1 мг/кг

Растворы для введения DS-8201 получали в день введения доз путем разбавления

исходного раствора DS-8201 (20,1 мг/мл) в 25 мМ гистидиновом буфере, 9% сахарозе (рН 5,5) до 0,6 мг/мл и 0,2 мг/мл для 3 мг/кг и 1 мг/кг растворов для введения соответственно. Каждый раствор для введения хорошо смешивали с применением пипетки перед введением с помощью инъекции IV в объеме дозы 5 мл/кг.

Составление AZD5305 при 1 мг/кг

Для составления 1 мг/кг раствора для введения получали AZD5305 в концентрации 0,1 мг/мл, что обеспечивало объем дозы 10 мл/кг для введения доз PO. Всего требовалось 49 мл среды-носителя. К соединению добавляли 15 мкл 1 М HCl и хорошо смешивали встряхиванием. В пробирку Эппендорфа добавляли 1 мл стерильной воды и хорошо смешивали с помощью пестика для гранул. Соединение обрабатывали ультразвуком в течение примерно 5 минут, затем содержимое переносили в стеклянную бутылку. Для промывки пробирки Эппендорфа от любого оставшегося соединения использовали стерильную воду объемом 1 мл, а затем переносили в стеклянную бутылку. Оставшийся объем стерильной воды (37,2 мл; всего 80% от общего объема среды-носителя) добавляли в стеклянную бутылку и хорошо смешивали с помощью магнитной мешалки. рН раствора для введения доз доводили до рН 3,74, затем в стеклянную бутылку добавляли оставшуюся среду-носитель (9,772 мл стерильной воды) и хорошо смешивали с помощью магнитной мешалки. Раствор для введения доз защищали от света и ежедневно отбирали небольшую аликвоту для введения доз. Весь оставшийся раствор для введения доз хранили до 7 дней в холодильнике. Конечная форма для введения 1 мг/кг AZD5305 представляла собой прозрачный раствор.

Измерения

Подавление роста опухоли (TGI) рассчитывали следующим образом:

$$TGI\% = \{1 - (MTV \text{ с обработкой} / MTV, \text{ контроль})\} * 100,$$

где MTV=средний объем опухоли.

Статистическую значимость оценивали с применением одностороннего t-критерия ($\log(\text{относительный объем опухоли}) = \log(\text{конечный объем} / \text{начальный объем})$) в день конечного измерения, сравнивая с контролем со средой-носителем.

Результаты

Объемы опухолей для обработок с помощью DS-8201 или AZD5305 отдельно или с помощью DS-8201 в комбинации с AZD5305 показаны на фигуре 17. Данные представляют собой изменение объема опухоли с течением времени для групп обработки. Пунктирная линия на фигуре 17 представляет собой момент завершения периодов введения доз. Полную информацию о дозах и режимах введения смотрите в таблице 4 выше. Показанные значения представляют собой среднее значение \pm SEM; изначально n=10 для мышей, обработанных средой-носителем, и n=8 для всех других групп обработки.

Ответы с TGI (41 день, TGI%) после обработки с помощью DS-8201 или AZD5305 отдельно или с помощью DS-8201 в комбинации с AZD5305 в ксенотрансплантате NCI-N87 показаны в таблице 5.

Таблица 5

Группа обработки	TGI%, 41 день	р-значение по сравнению со средой-носителем	Значимость
DS-8201, 3 мг/кг	62%	0,00071	***
DS-8201, 1 мг/кг	25%	0,025	†ns
AZD5305, 1 мг/кг	40%	<0,0001	†ns
DS-8201, 1 мг/кг+AZD5305, 1 мг/кг	55%	<0,0001	**
DS-8201, 3 мг/кг+AZD5305, 1 мг/кг	90%	<0,0001	****

†незначимый

Монотерапия с помощью DS-8201 при 3 мг/кг показала значение TGI, составляющее 62% на день 41 после лечения. DS-8201 при 1 мг/кг показал TGI, составляющее 25%, в день 41 после обработки. Монотерапия с помощью AZD5305 обеспечивала достижение TGI, составляющего 40%, в день 41 после обработки. Комбинированная обработка с помощью AZD5305 с DS-8201 при 1 мг/кг приводила к TGI, составляющему 55% через 41 день после обработки. Комбинированная терапия с применением более высокой дозы DS-8201, составляющей 3 мг/кг, с AZD5305 обеспечивала достижение значимого TGI, составляющего 90%, в день 41 после обработки и показывала лучший ответ, чем любое из соответствующих средств монотерапии.

Группы обработки в целом хорошо переносили (два выпадающих животных были исключены из исследования из-за потери массы тела >15%), а средняя масса тела во всех группах лечения оставалась стабильной в течение исследования.

Пример 6.

Комбинированное введение доз конъюгата антитела и лекарственного средства DS-8201 (трастузумаб дерукстекан (Enhertu[®])) с селективным ингибитором PARP1 AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид) в *in vitro* клеточных линиях, экспрессирующих HER2 на высоком уровне, HER2 на низком уровне и мутант HER2.

Способ

Проводили высокопродуктивный скрининг комбинаций, в котором четыре клеточные линии рака легкого с различной экспрессией HER2 (таблица 6) и линия раковых клеток с мутантом HER2 (таблица 7) были подвергнуты скринингу с комбинациями DS-8201 и AZD5305.

Таблица 6

Клеточная линия	Рецепторы HER2 на клетку по данным проточной цитометрии	IHC Dako H2L Н-балл	Тип рака
HCC1171	146050 ± 654	200	Аденокарцинома NSCLC
NCIH1573	51090 ± 165	100	Аденокарцинома NSCLC
NCIH2170	2472499 ± 21851	300	Плоскоклеточный NSCLC
Calu6	12935 ± 200	0	Аденокарцинома NSCLC

Таблица 7

Клеточная линия	Рецепторы HER2 на клетку по данным проточной цитометрии	Мутация HER2	Тип рака
5637	27497 ± 14	p.S310F	Мочевыводящие пути

Показания скрининга представляли собой 7-дневный клеточный анализ жизнеспособности клеток Titer-Glo, проводимый в виде матрицы 6×6 доза-ответ (каждый из DS-8201 и AZD5305 при полулогарифмических серийных разведениях для каждой комбинации). Максимальная концентрация составляла 3,33 или 10 мкМ для AZD5305 и 100 мкг/мл для DS-8201. Активность комбинации оценивали на основе комбинации ΔE_{max} и баллов синергии согласно Loewe.

Результаты

Результаты показаны для клеточных линий HER2+, с низкой экспрессией HER2, низкой/нулевой экспрессией HER2 NSCLC (HCC1171, NCIH1573, NCIH2170, Calu6) на фигурах 18A, 18B и 18C и в таблице 8, а также для мутантной клеточной линии HER2 (5637) на фигурах 19A, 19B и 19C и в таблице 9.

На фигурах 18A и 19A показаны матрицы измеренных сигналов жизнеспособности клеток. Ось X представляет собой лекарственное средство A (DS-8201), а ось Y представляет собой лекарственное средство B (AZD5305). Значения в рамке представляют собой соотношение клеток, обработанных лекарственными средствами A и B, по сравнению с контролем с DMSO в день 7. Все значения нормализованы относительно значений жизнеспособности клеток в день 0. Значения от 0 до 100 представляют собой подавление роста в %, а значения выше 100 представляют собой гибель клеток.

На фигурах 18B и 19B показаны матрицы избытка согласно Loewe. Значения в рамке представляют собой значения избытка, рассчитанные с помощью модели аддитивности согласно Loewe.

На фигурах 18C и 19C показаны матрицы избытка согласно HSA. Значения в рамке представляет собой значения избытка, рассчитанные с помощью модели HSA (наилучшее отдельное средство).

В таблицах 8 и 9 показаны баллы синергии согласно HSA и баллы аддитивности

согласно Loewe.

Таблица 8

Клеточная линия (NSCLC)	HCC1171	NCIH1573	NCIH2170	Calu6
Балл синергии согласно HSA	6,2	6,14	33,99	10,55
Балл синергии согласно Loewe	6,2	5,4	33,99	10,55

Таблица 9

Клеточная линия (Мочевыводящие пути)	5637
Балл синергии согласно HSA	11,2
Балл синергии согласно Loewe	11,2

Как видно из фигур 18А, 18В и 18С, а также из таблицы 8, AZD5305 синергетически взаимодействует с DS-8201, а также увеличивает степень гибели клеток в клеточной линии HER2+ NCIH2170 при E_{max} (0,125 мкМ AZD5305 и 100 мкг/мл DS-8201), в клеточной линии с низкой экспрессией HER2 HCC1171 при E_{max} (0,125 мкМ AZD5305 и 100 мкг/мл DS-8201) и в клеточной линии с низкой/нулевой экспрессией HER2 Calu6 при E_{max} (1,25 мкМ AZD5305 и 100 мкг/мл DS-8201). Активность комбинации наблюдали даже там, где активность одного средства отсутствовала или была низкой. Хотя в клеточной линии NCIH1573 наблюдали синергию, гибель клеток отсутствовала.

Как видно из фигур 19А, 19В и 19С, а также из таблицы 9, AZD5305 синергетически взаимодействовал с DS-8201, а также увеличивал степень гибели клеток в клеточной линии с мутантом HER2 5637 при E_{max} (1,25 мкМ AZD5305 и 100 мкг/мл DS-8201). Активность комбинации наблюдали даже там, где AZD5305 в качестве отдельного средства не был активен.

Изложенное выше письменное описание считается достаточным, чтобы дать возможность специалисту в данной области техники реализовать на практике варианты осуществления. В изложенных выше описании и примерах подробно определены некоторые варианты осуществления и описан наилучший способ осуществления, предполагаемый авторами настоящего изобретения. Будет понятно, однако, что независимо от того, насколько подробно изложенное выше может быть представлено в тексте, варианты осуществления можно реализовать на практике множеством способов, а формула изобретения охватывает любые их эквиваленты.

Перечень последовательностей в развернутой форме

SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к HER2

SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к HER2

SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность CDRH1 тяжелой цепи [=

аминокислотные остатки 26-33 из SEQ ID NO: 1]

SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность CDRH2 тяжелой цепи [= аминокислотные остатки 51-58 из SEQ ID NO: 1]

SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность CDRH3 тяжелой цепи [= аминокислотные остатки 97-109 из SEQ ID NO: 1]

SEQ ID NO: 6. Аминокислотная последовательность CDRL1 легкой цепи [= аминокислотные остатки 27-32 из SEQ ID NO: 2]

SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность, содержащая аминокислотную последовательность CDRL2 легкой цепи (SAS) [= аминокислотные остатки 50-56 из SEQ ID NO: 2]

SEQ ID NO: 8. Аминокислотная последовательность CDRL3 легкой цепи [= аминокислотные остатки 89-97 из SEQ ID NO: 2]

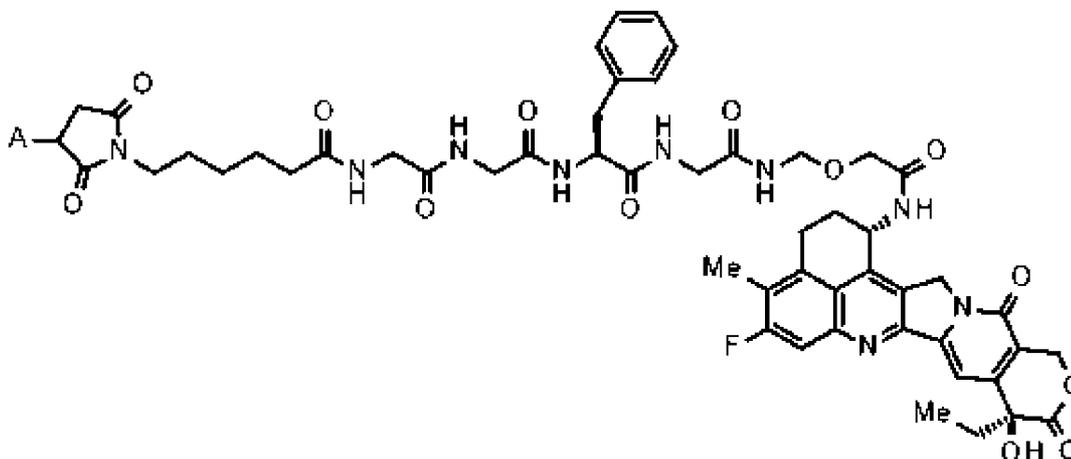
SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи [= аминокислотные остатки 1-120 из SEQ ID NO: 1]

SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи [= аминокислотные остатки 1-107 из SEQ ID NO: 2]

SEQ ID NO: 11. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи [= аминокислотные остатки 1-449 из SEQ ID NO: 1]

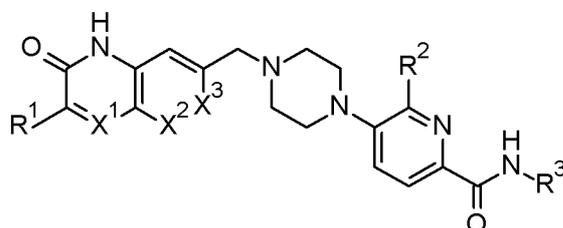
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический продукт, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для введения в комбинации, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, в котором фрагмент лекарственное средство-линкер, представленный следующей формулой:



где А представляет собой положение присоединения к антителу, конъюгирован с антителом к HER2 посредством тиоэфирной связи.

2. Фармацевтический продукт по п. 1, где селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой (I),



(I),

где

каждый из X^1 и X^2 независимо выбран из N и C(H),

X^3 независимо выбран из N и C(R^4), где R^4 представляет собой H или фтор,

R^1 представляет собой C_{1-4} алкил или C_{1-4} фторалкил,

R^2 независимо выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила, и

R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль,

при условии, что

если X^1 представляет собой N, то X^2 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4),

если X^2 представляет собой N, то X^1 представляет собой C(H), и X^3 представляет собой C(R^4), и

если X^3 представляет собой N, то X^1 и X^2 одновременно представляют собой C(H).

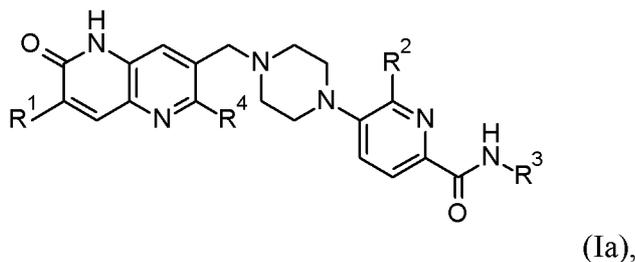
3. Фармацевтический продукт по п. 2,

где в формуле (I) R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

4. Фармацевтический продукт по п. 2, где в формуле (I) R^3 представляет собой метил.

5. Фармацевтический продукт по любому из пп. 2-4, где в формуле (I) R^1 представляет собой этил.

6. Фармацевтический продукт по п. 1, где селективный ингибитор PARP1 представляет собой соединение, представленное следующей формулой (Ia),



где

R^1 представляет собой C_{1-4} алкил,

R^2 выбран из H, галогена, C_{1-4} алкила и C_{1-4} фторалкила,

R^3 представляет собой H или C_{1-4} алкил, и

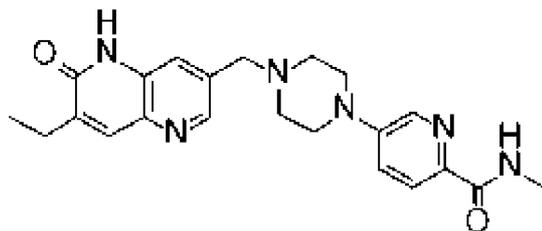
R^4 представляет собой H,

или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Фармацевтический продукт по п. 6, где в формуле (Ia) R^2 представляет собой H или галоген.

8. Фармацевтический продукт по п. 6, где в формуле (Ia) R^1 представляет собой этил, R^2 выбран из H, хлора и фтора, и R^3 представляет собой метил.

9. Фармацевтический продукт по п. 1, где селективный ингибитор PARP1 представляет собой AZD5305, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Фармацевтический продукт по любому из пп. 1-9, где антитело к HER2 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 3, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 5, и легкую цепь, содержащую CDRL1, состоящую из аминокислотной

17. Фармацевтический продукт по любому из пп. 1-15, где продукт представляет собой комбинированный препарат, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для последовательного или одновременного введения.

18. Фармацевтический продукт по любому из пп. 1-17, где продукт предназначен для лечения рака.

19. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого, рака пищевода, рака головы и шеи, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока, болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, стромальной опухоли пищеварительного тракта, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмоцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы.

20. Фармацевтический продукт по п. 19, где рак представляет собой рак молочной железы.

21. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 3+.

22. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с низкой экспрессией HER2.

23. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 2+.

24. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 1+.

25. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, который больше 0 и меньше 1+.

26. Фармацевтический продукт по п. 20, где рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

27. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак желудка.

28. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой колоректальный рак.

29. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак легкого.

30. Фармацевтический продукт по п. 29, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

31. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

32. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак яичника.

33. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак предстательной железы.

34. Фармацевтический продукт по п. 18, где рак представляет собой рак почки.

35. Фармацевтический продукт по любому из пп. 1-17 для применения в лечении рака.

36. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого, рака пищевода, рака головы и шеи, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока, болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, стромальной опухоли пищеварительного тракта, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы.

37. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак молочной железы.

38. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 3+.

39. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с низкой экспрессией HER2.

40. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 2+.

41. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 1+.

42. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, который больше 0 и меньше 1+.

43. Фармацевтический продукт для применения по п. 37, где рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

44. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак желудка.

45. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой колоректальный рак.

46. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак легкого.

47. Фармацевтический продукт для применения по п. 46, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

48. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет

собой рак поджелудочной железы.

49. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак яичника.

50. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак предстательной железы.

51. Фармацевтический продукт для применения по п. 35, где рак представляет собой рак почки.

52. Применение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства или селективного ингибитора PARP1 в изготовлении лекарственного препарата для введения конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 в комбинации, где конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1 определены в любом из пп. 1-15, для лечения рака.

53. Применение по п. 52, где рак представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого, рака пищевода, рака головы и шеи, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока, болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, стромальной опухоли пищеварительного тракта, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмоцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы.

54. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак молочной железы.

55. Применение по п. 54, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 3+.

56. Применение по п. 54, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с низкой экспрессией HER2.

57. Применение по п. 54, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 2+.

58. Применение по п. 54, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 1+.

59. Применение по п. 54, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, который больше 0 и меньше 1+.

60. Применение по п. 54, где рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

61. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак желудка.

62. Применение по п. 52, где рак представляет собой колоректальный рак.

63. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак легкого.

64. Применение по п. 63, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный

рак легкого.

65. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

66. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак яичника.

67. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак предстательной железы.

68. Применение по п. 52, где рак представляет собой рак почки.

69. Применение по любому из пп. 52-68, где лекарственный препарат представляет собой композицию, содержащую конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для одновременного введения.

70. Применение по любому из пп. 52-68, где лекарственный препарат представляет собой комбинированный препарат, содержащий конъюгат антитела к HER2 и лекарственного средства и селективный ингибитор PARP1, для последовательного или одновременного введения.

71. Способ лечения рака, включающий введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 по любому из пп. 1-15 в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом.

72. Способ по п. 71, где рак представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака, рака легкого, рака пищевода, рака головы и шеи, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака желчного протока, болезни Паджета, рака поджелудочной железы, рака яичника, карциносаркомы матки, уротелиального рака, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальной стромальной опухоли, стромальной опухоли пищеварительного тракта, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака брюшины, рака печени, гепатоцеллюлярного рака, карциномы тела матки, рака почки, рака вульвы, рака щитовидной железы, рака полового члена, лейкоза, злокачественной лимфомы, плазмоцитомы, миеломы, мультиформной глиобластомы, остеосаркомы, саркомы и меланомы.

73. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак молочной железы.

74. Способ по п. 73, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 3+.

75. Способ по п. 73, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с низкой экспрессией HER2.

76. Способ по п. 73, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 2+.

77. Способ по п. 73, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, составляющим 1+.

78. Способ по п. 73, где рак молочной железы характеризуется баллом статуса HER2 согласно ИНС, который больше 0 и меньше 1+.

79. Способ по п. 73, где рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

80. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак желудка.

81. Способ по п. 71, где рак представляет собой колоректальный рак.
82. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак легкого.
83. Способ по п. 82, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
84. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.
85. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак яичника.
86. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак предстательной железы.
87. Способ по п. 71, где рак представляет собой рак почки.
88. Способ по любому из пп. 71-87, где способ включает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 последовательно.
89. Способ по любому из пп. 71-87, где способ включает введение конъюгата антитела к HER2 и лекарственного средства и селективного ингибитора PARP1 одновременно.

По доверенности

[Фигура 1]

SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к HER2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Фигура 2]

SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к HER2
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Фигура 3]

SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность CDRH1 тяжелой цепи
GFNIKDTY

[Фигура 4]

SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность CDRH2 тяжелой цепи
IYPTNGYT

[Фигура 5]

SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность CDRH3 тяжелой цепи

S R W G G D G F Y A M D Y

[Фигура 6]

SEQ ID NO: 6. Аминокислотная последовательность CDRL1 легкой цепи

Q D V N T A

[Фигура 7]

SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность, содержащая аминокислотную последовательность CDRL2 легкой цепи (SAS)

S A S F L Y S

[Фигура 8]

SEQ ID NO: 8. Аминокислотная последовательность CDRL3 легкой цепи

Q Q H Y T T P P T

[Фигура 9]

SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R
Q A P G K G L E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K
N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T
L V T V S S

[Фигура 10]

SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи

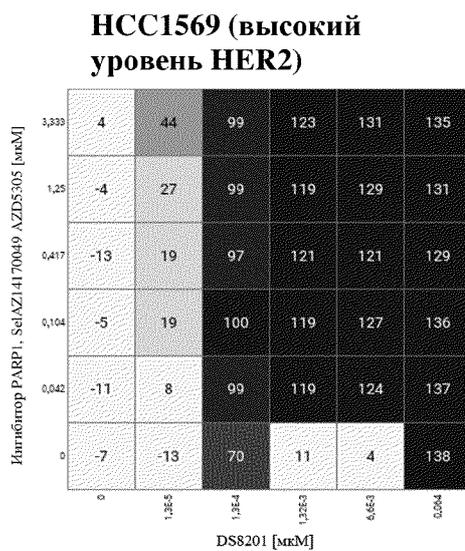
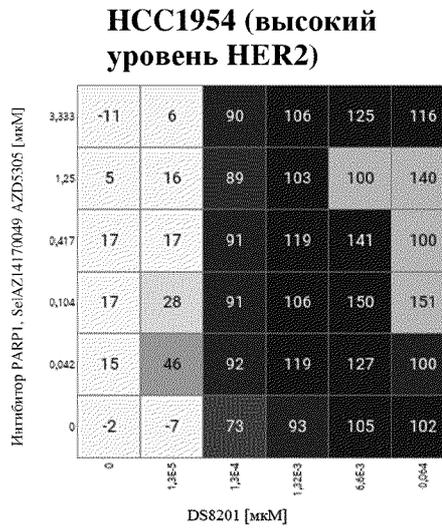
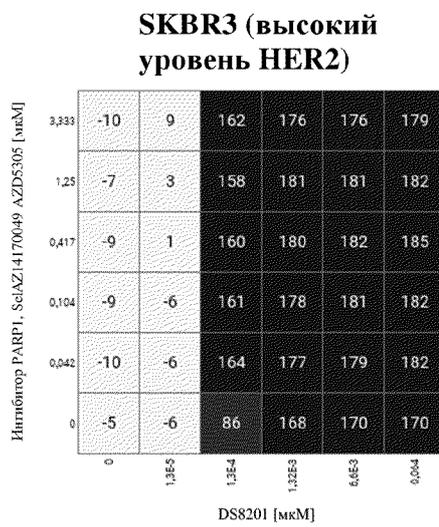
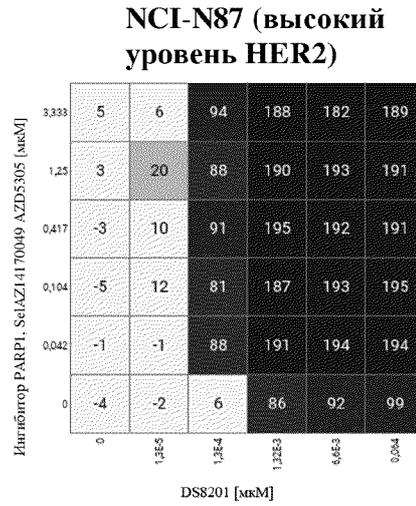
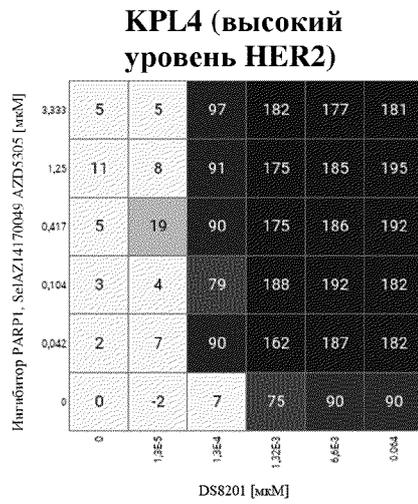
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q
K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K

[Фигура 11]

SEQ ID NO: 11. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи

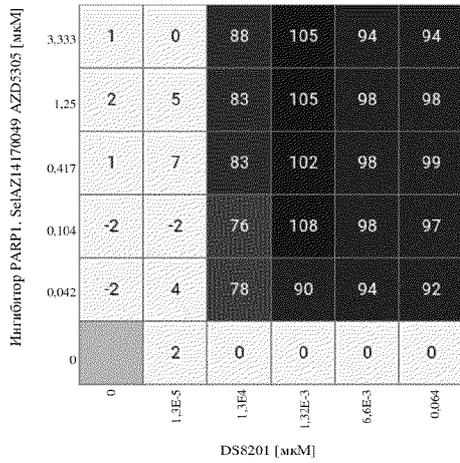
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTH
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[Фигура 12А]

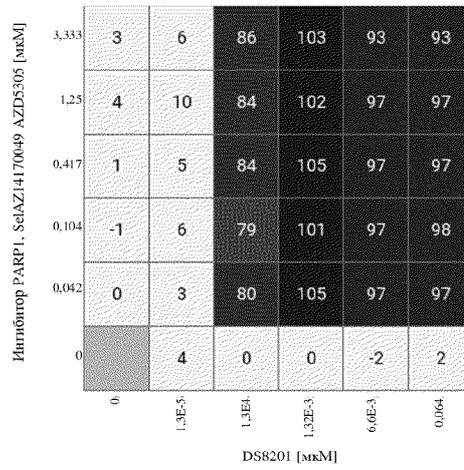


[Фигура 12В]

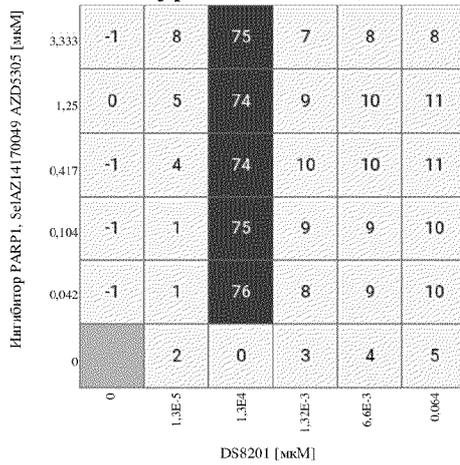
KPL4 (высокий уровень HER2)



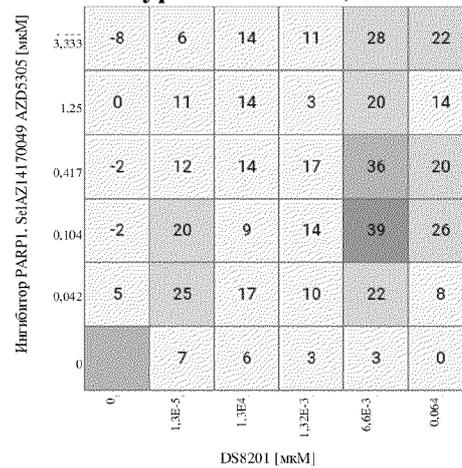
NCI-N87 (высокий уровень HER2)



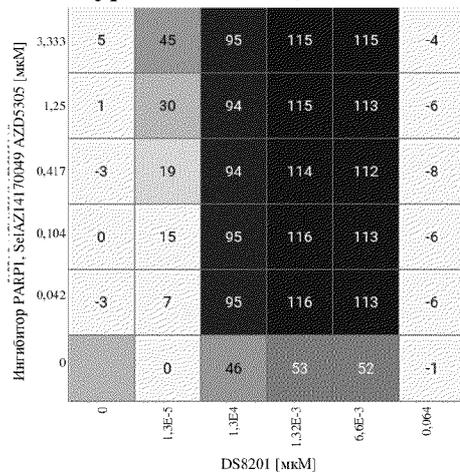
SKBR3 (высокий уровень HER2)



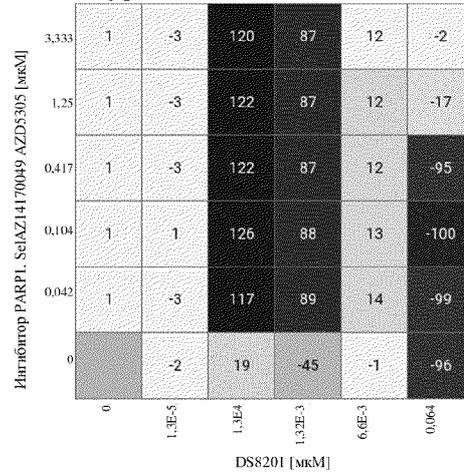
HCC1954 (высокий уровень HER2)



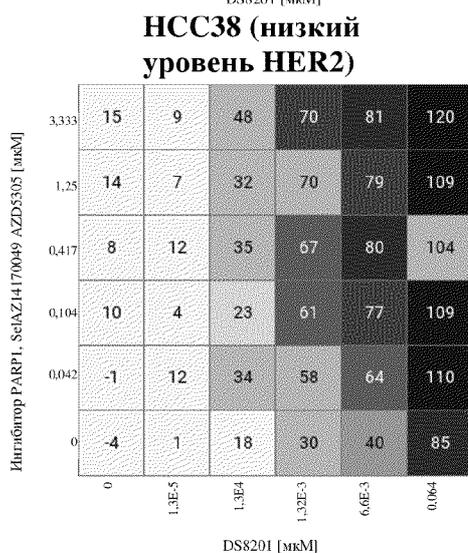
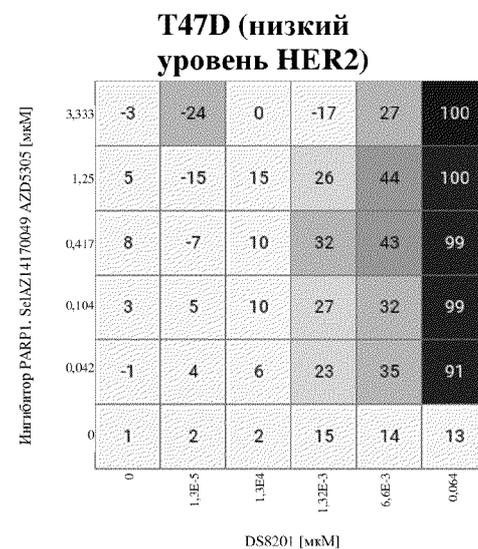
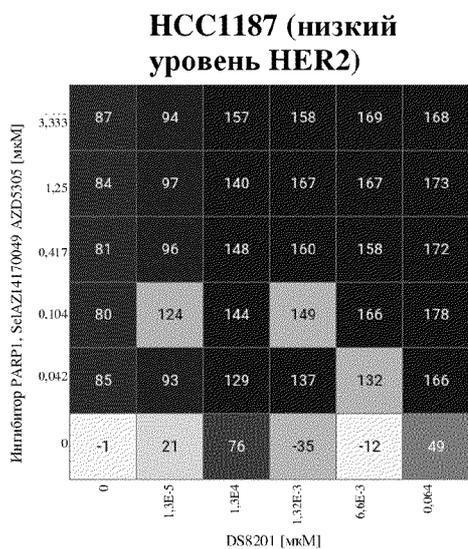
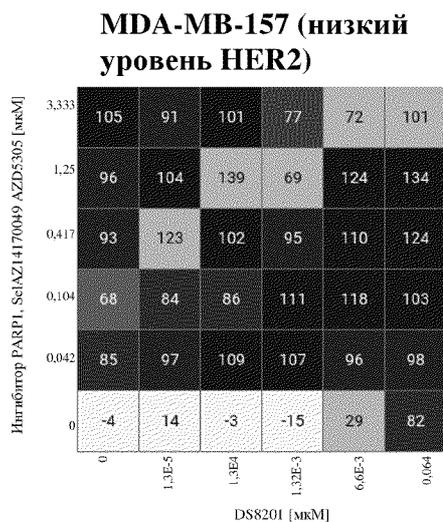
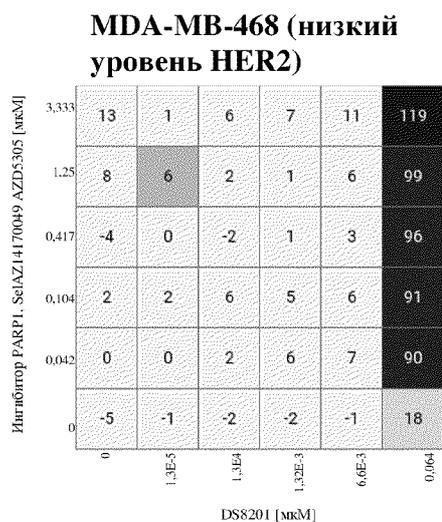
HCC1569 (высокий уровень HER2)



AU565 (высокий уровень HER2)

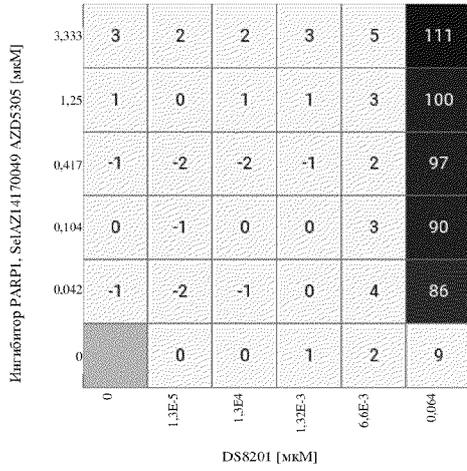


[Фигура 13А]

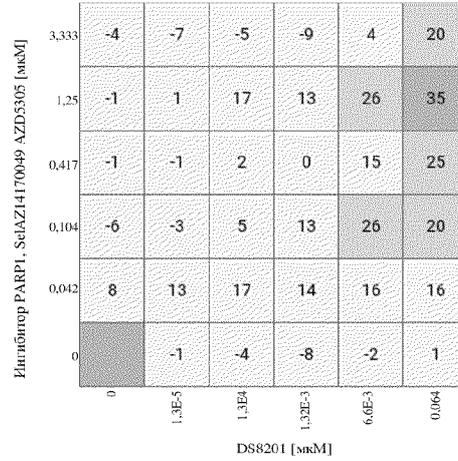


[Фигура 13В]

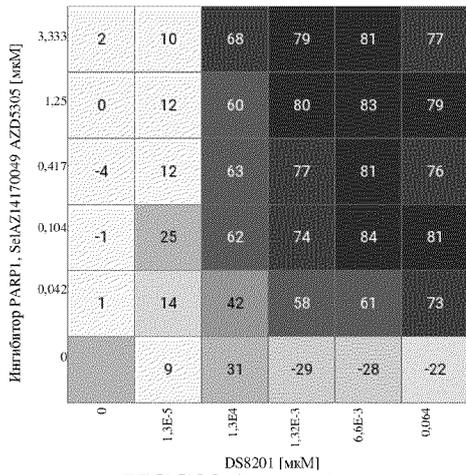
MDA-MB-468 (низкий уровень HER2)



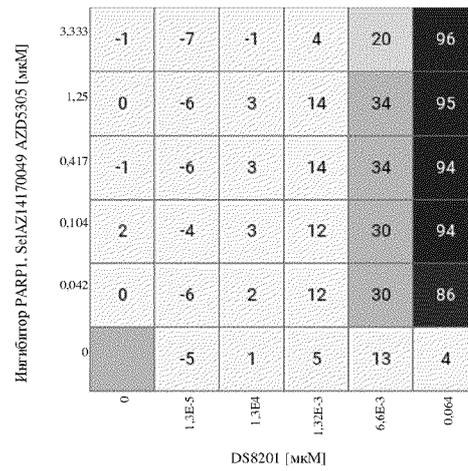
MDA-MB-157 (низкий уровень HER2)



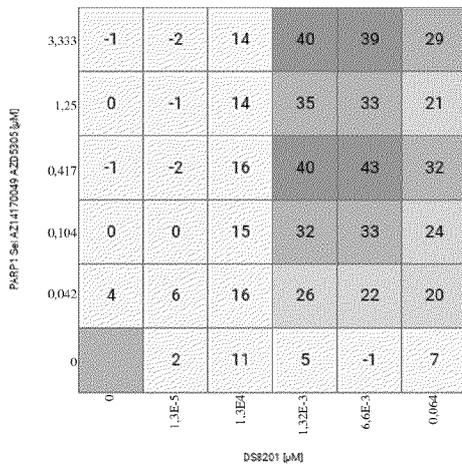
HCC1187 (низкий уровень HER2)



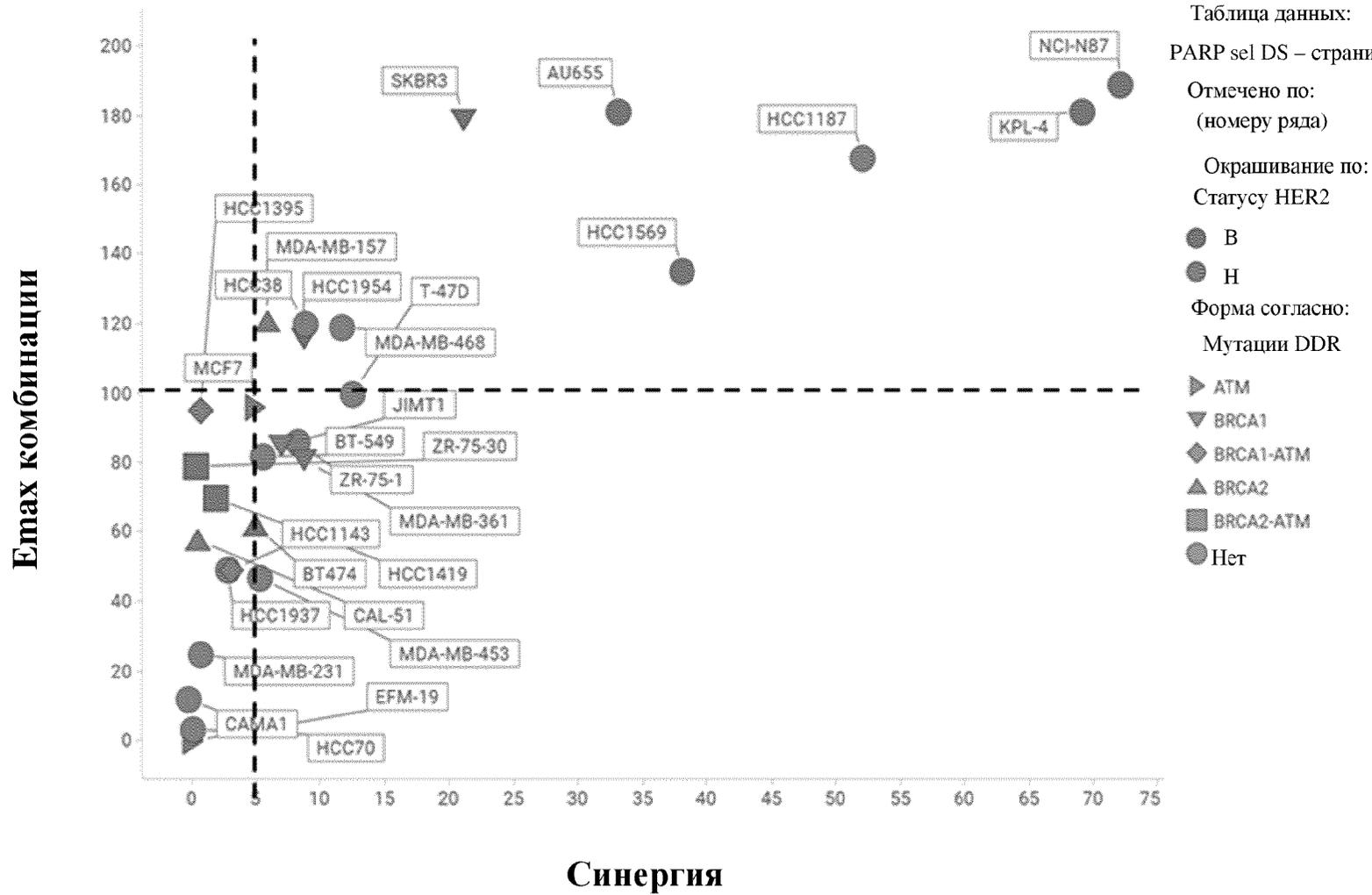
T47D (низкий уровень HER2)



HCC38 (низкий уровень HER2)

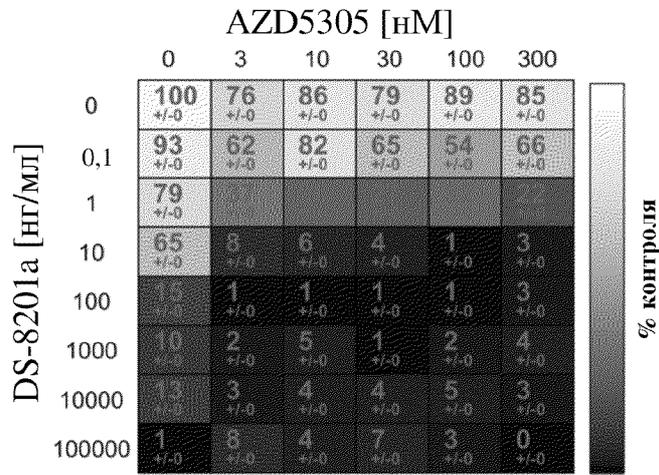


DS8201 + AZD5305

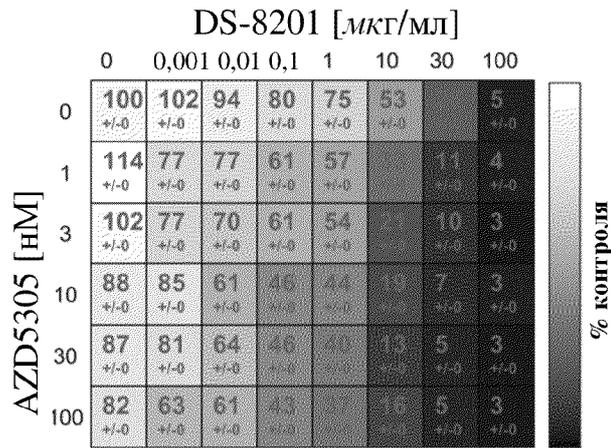


[Фигура 14]

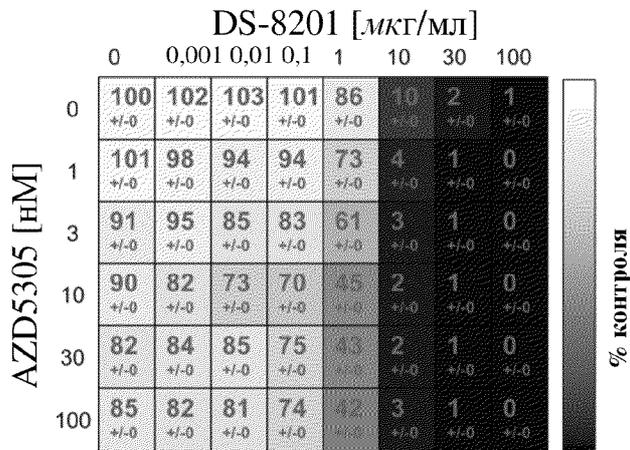
[Фигура 15А]



DS-8201a против AZD5305 в KPL4

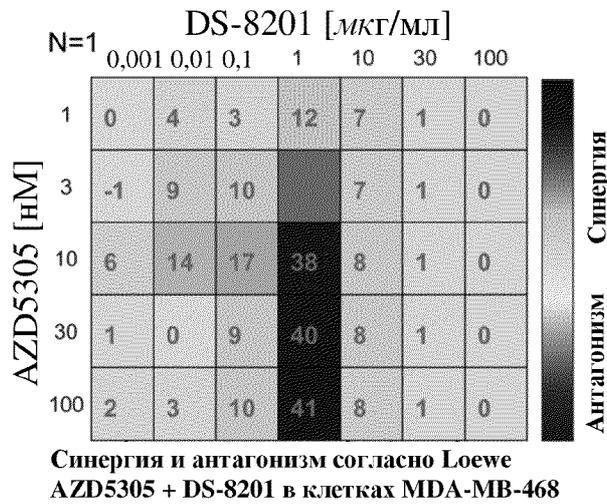
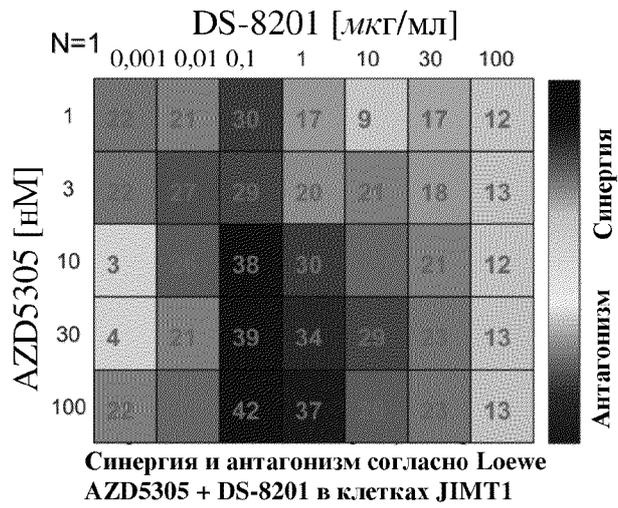
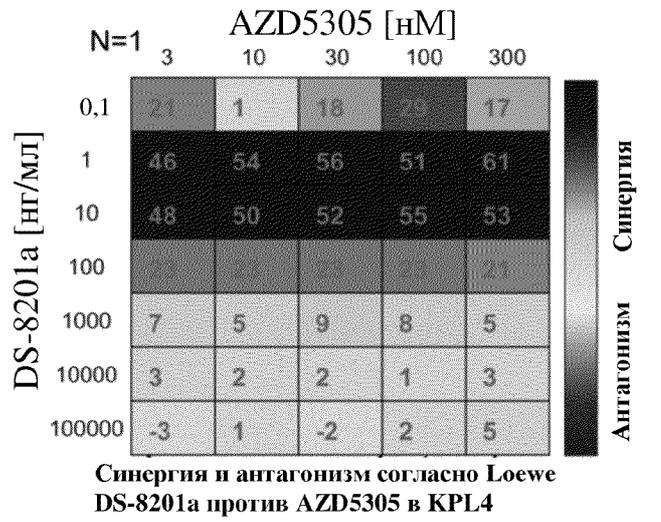


AZD5305 + DS-8201 в клетках JIMT1



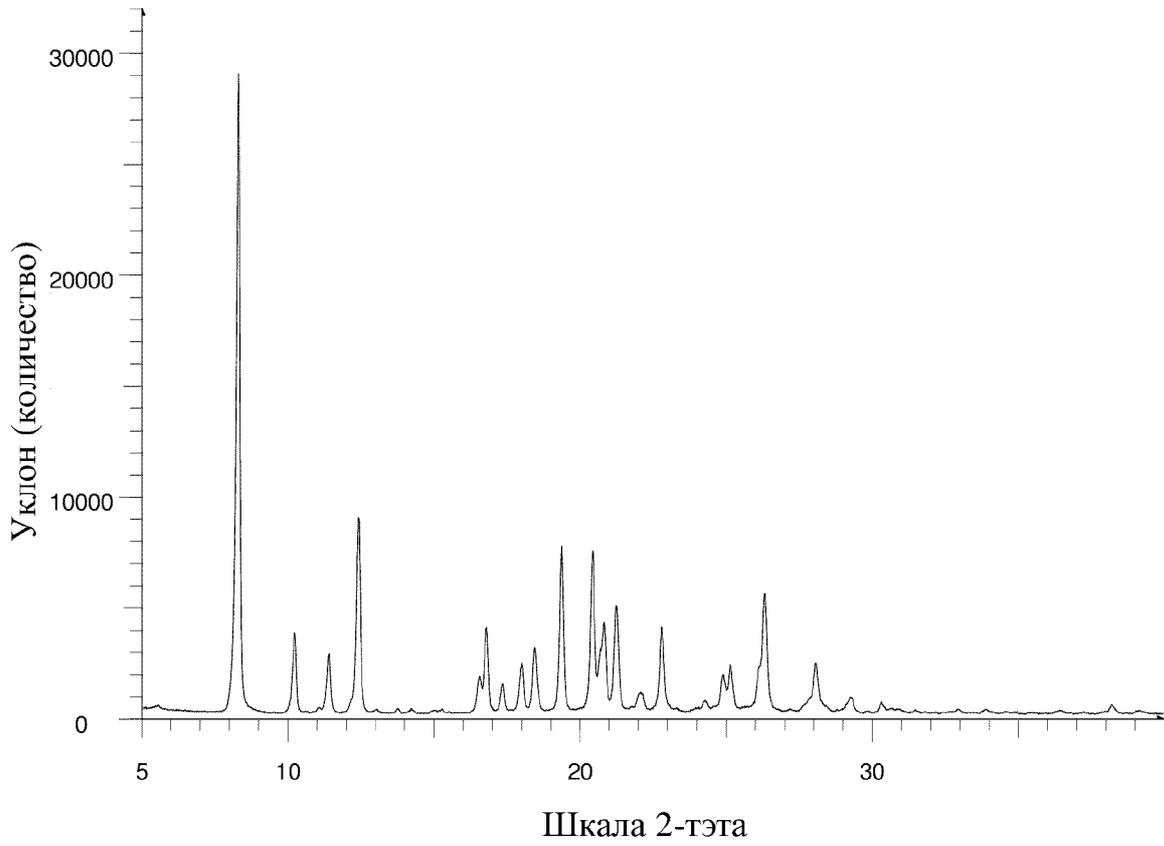
AZD5305 + DS-8201 в клетках MDA-MB-468

[Фигура 15В]



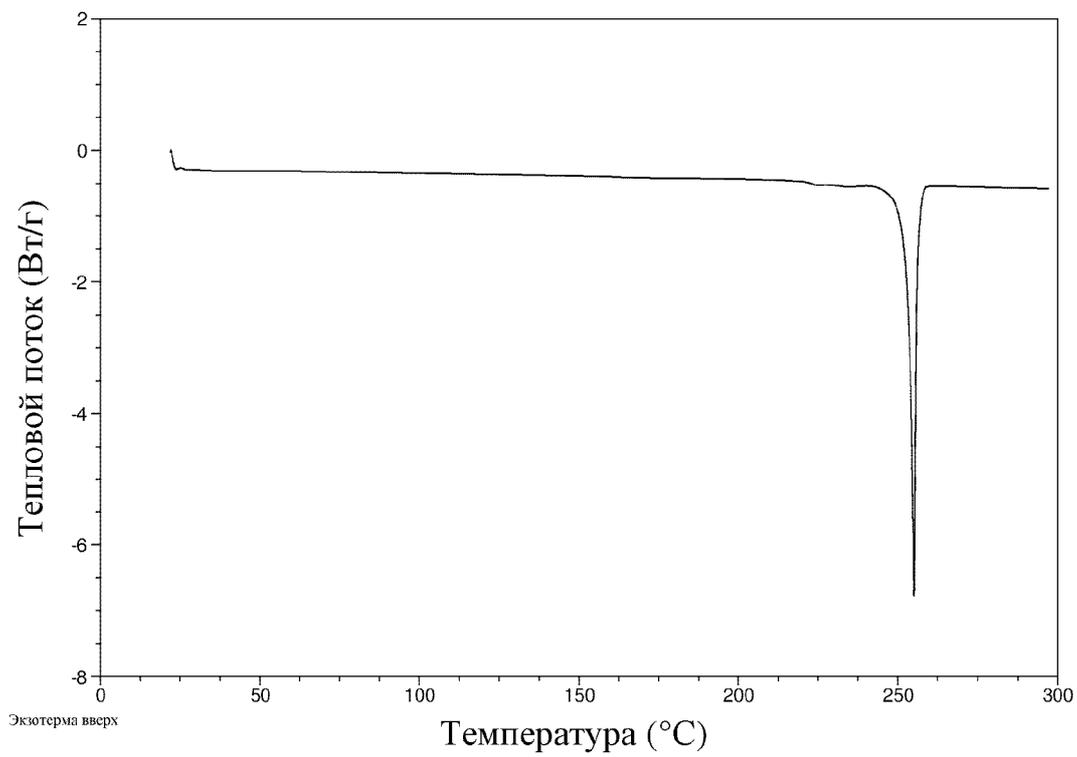
11/17

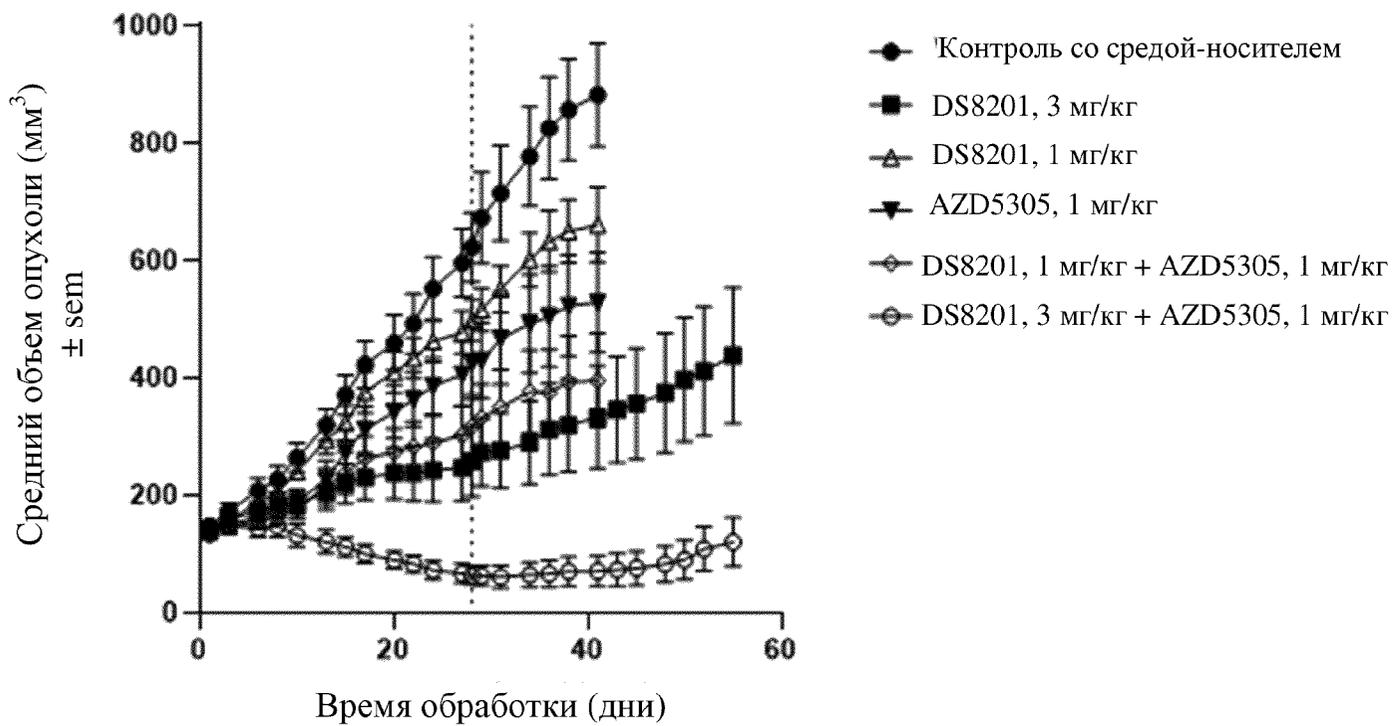
[Фигура 16А]



12/17

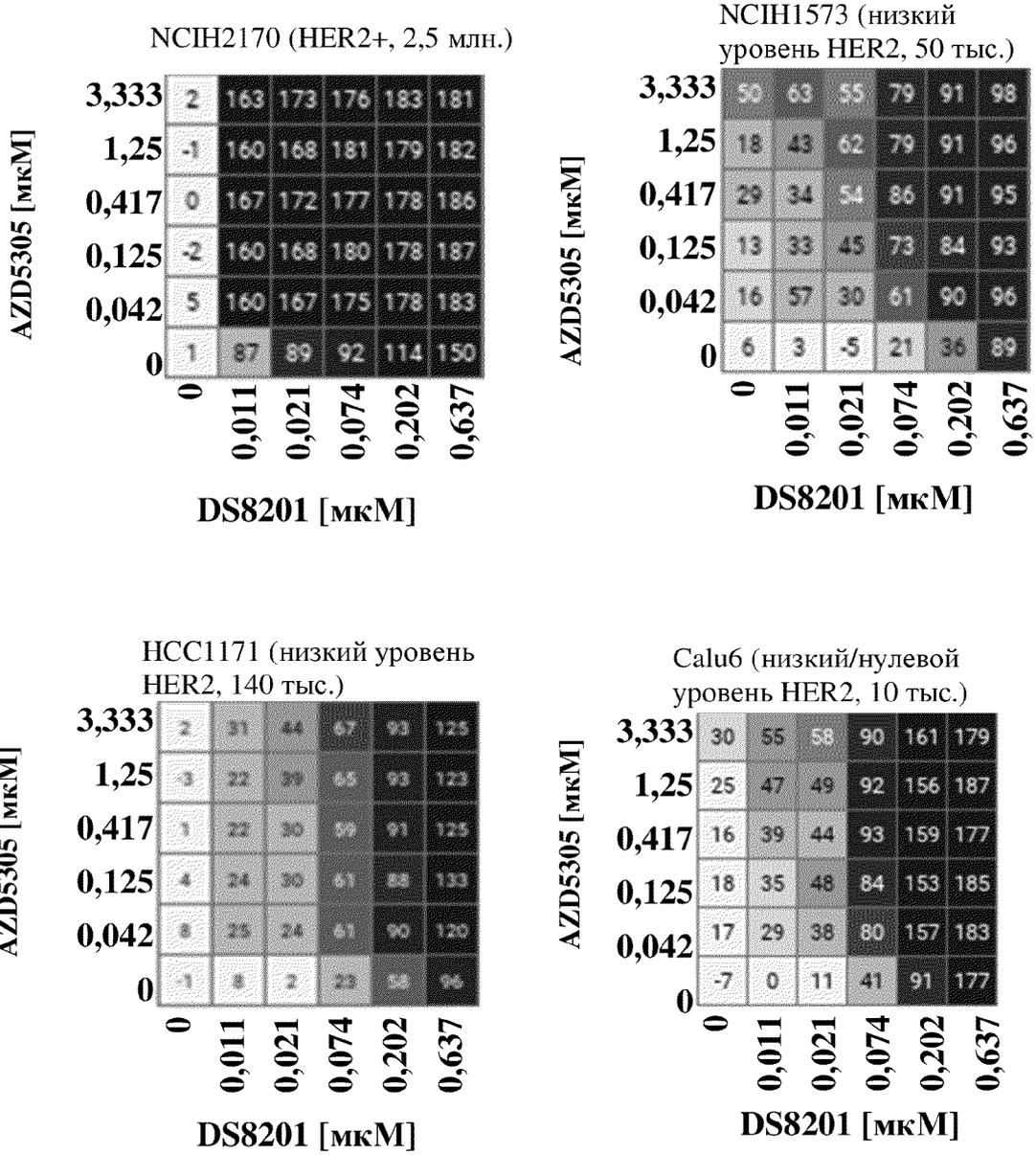
[Фигура 16В]



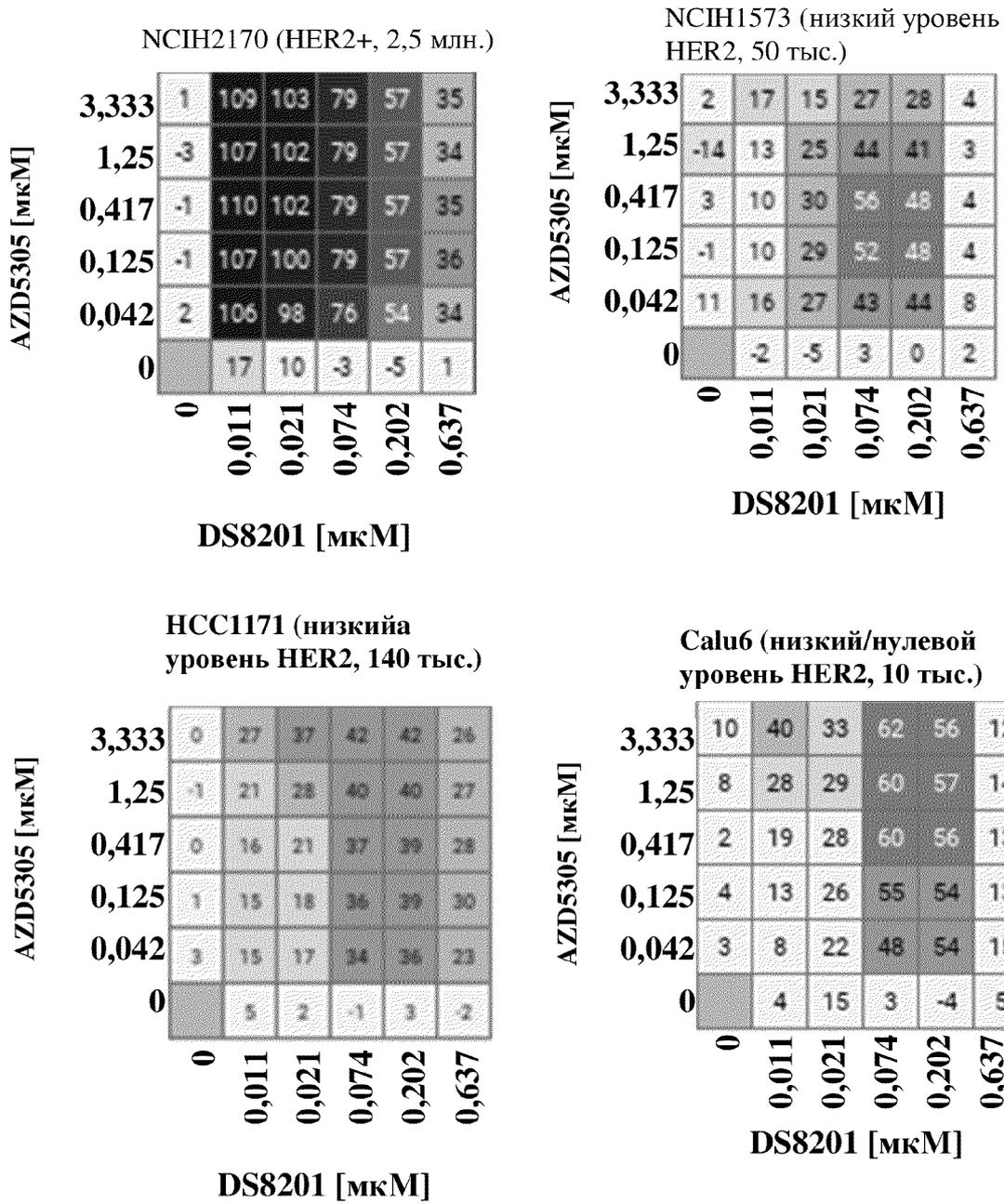


[Фигура 17]

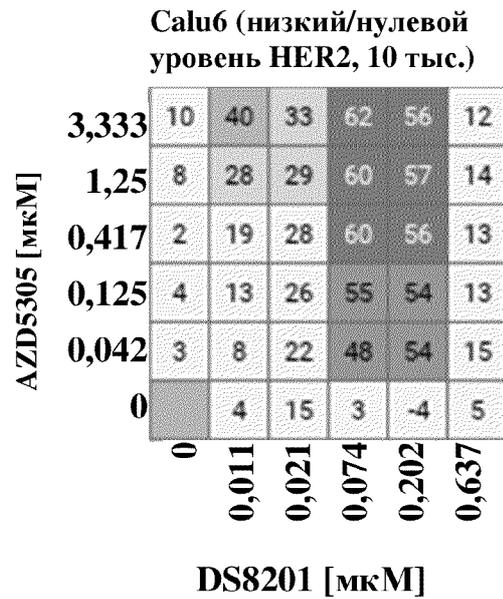
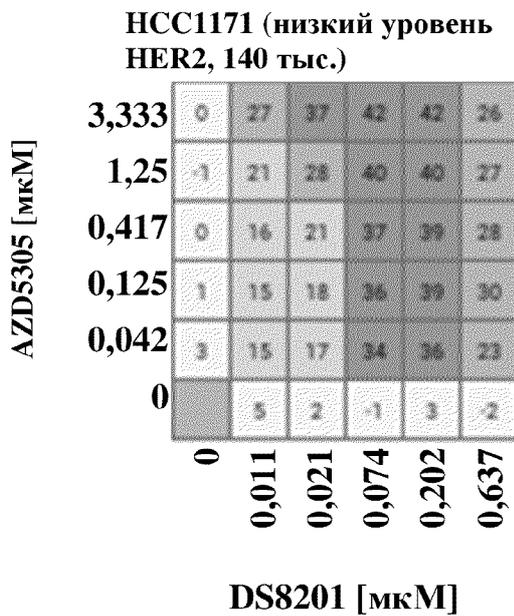
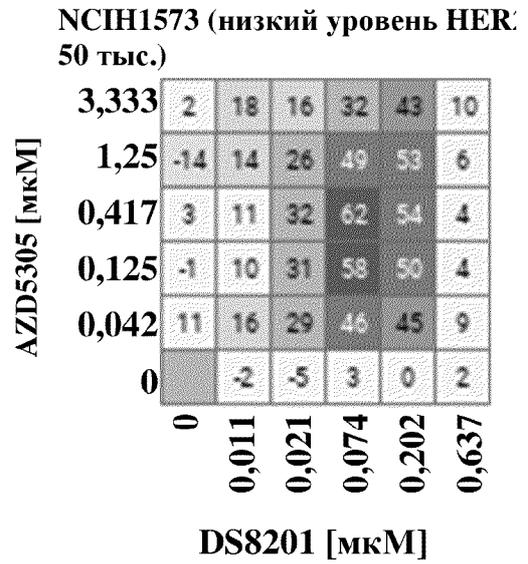
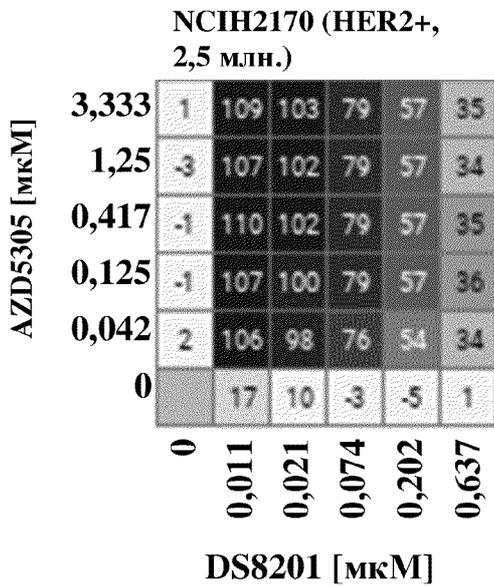
[Фигура 18А]



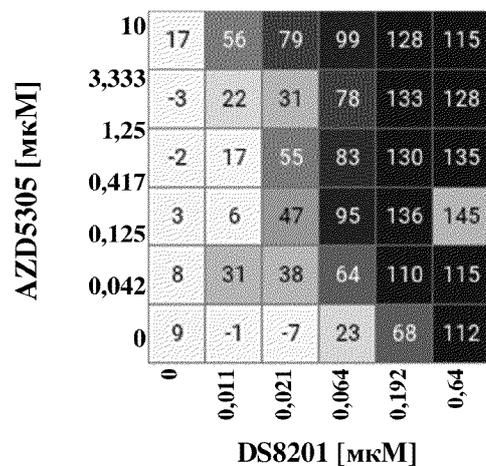
[Фигура 18В]



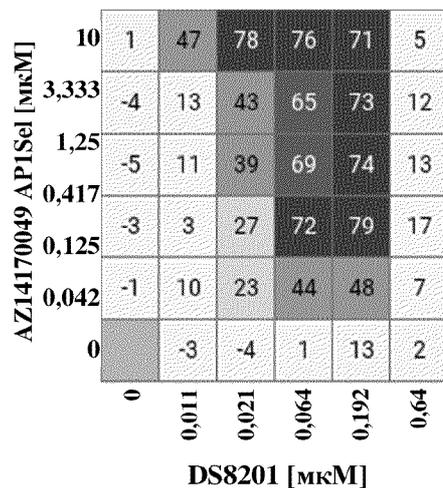
[Фигура 18С]



[Фигура 19А]



[Фигура 19В]



[Фигура 19С]

