

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393527 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.21(22) Дата подачи заявки  
2022.06.16(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/53 (2006.01)  
C07C 1/00 (2006.01)  
C07D 487/10 (2006.01)

(54) БЕЗИЛАТНАЯ СОЛЬ (R)-N-ЭТИЛ-5-ФТОР-N-ИЗОПРОПИЛ-2-((5-(2-(6-((2-МЕТОКСИЭТИЛ)(МЕТИЛ)АМИНО)-2-МЕТИЛГЕКСАН-3-ИЛ)-2,6-ДИАЗАСПИРО[3,4]ОКТАН-6-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗИН-6-ИЛ)ОКСИ)БЕНЗАМИДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ТАКИХ КАК РАК

(31) PCT/CN2021/100466;  
PCT/CN2022/091677

(32) 2021.06.17; 2022.05.09

(33) CN

(86) PCT/CN2022/099089

(87) WO 2022/262796 2022.12.22

(71) Заявитель:  
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

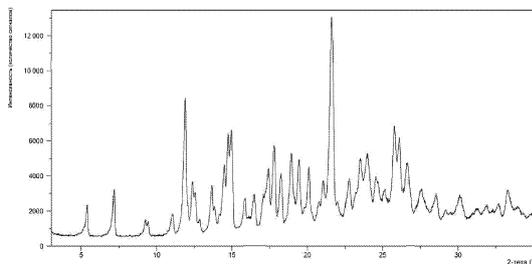
(72) Изобретатель:

Цай Вэй, Дай Сюэдун (CN), Керолль  
Оливье Алексис Жорж (FR), Тюринг  
Йоханнес Вилхелмус Й. (BE), Ын  
Алиша Ти Фуай (CN), Дарвилл  
Николаас Фредди Жак Бруно, Гертман  
Роберт Михаэл, Ахуджа Дипали (BE),  
Лю Интао (CN), Панде Винит (BE),  
Клейтор Эдвард (GB), Бен Хайм  
Сирил, Смолдерс Симон Ян С (BE)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к безилатной соли (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3,4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольватам. Данное соединение может быть использовано для лечения и/или профилактики у млекопитающего, фармацевтической композиции, содержащей данное соединение, и применения в качестве ингибитора белок-белкового взаимодействия менин/MLL, используемого для лечения таких заболеваний, как рак, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабет.



A1

202393527

202393527

A1

БЕЗИЛАТНАЯ СОЛЬ (R)-N-ЭТИЛ-5-ФТОР-N-ИЗОПРОПИЛ-2-((5-(2-(6-((2-  
МЕТОКСИЭТИЛ)(МЕТИЛ)АМИНО)-2-МЕТИЛГЕКСАН-3-ИЛ)-2,6-  
5 ДИАЗАСПИРО[3.4]ОКТАН-6-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗИН-6-ИЛ)ОКСИ)БЕНЗАМИДА ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ТАКИХ КАК РАК

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к  
10 безилатной соли (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-  
метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-  
триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольватам.  
Данное соединение может быть использовано для лечения и/или профилактики у  
млекопитающего, фармацевтической композиции, содержащей данное соединение, и  
15 применения в качестве ингибитора белок-белкового взаимодействия менин/MLL,  
используемого для лечения таких заболеваний, как рак, включая, без ограничений,  
лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные  
новообразования (MPN); и диабет.

#### 20 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хромосомные перестройки, влияющие на ген недифференцированного лейкоза (*MLL*;  
*MLL1*; *KMT2A*), приводят к агрессивным острым лейкозам во всех возрастных группах  
и по-прежнему представляют собой по большей части неизлечимые заболевания, что  
указывает на насущную потребность в новых терапевтических подходах. Острые  
25 лейкозы, несущие такие хромосомные транслокации *MLL*, представлены  
лимфоидными, миелоидными или бифенотипическими заболеваниями и составляют от  
5 до 10% острых лейкозов у взрослых и приблизительно 70% у младенцев (Marschalek,  
Br J Haematol 2011. 152(2), 141-54; Tomizawa et al., Pediatr Blood Cancer 2007. 49(2),  
127-32).

30 *MLL* представляет собой гистонметилтрансферазу, которая метилирует гистон H3 на  
лизине 4 (H3K4) и функционирует в мультибелковых комплексах. Применение  
индуцибельных аллелей с потерей функций *Mll1* показало, что *Mll1* играет важную  
роль в поддержании гематopoэтических стволовых клеток (HSCs) и развитии В-клеток,

хотя для гематопозеза не требуется активность его гистонметилтрансферазы (Mishra et al., Cell Rep 2014. 7(4), 1239-47).

К настоящему времени сообщалось о слиянии MLL с более чем 60 различными партнерами, что связано с формированием/прогрессированием лейкоза (Meyer et al., Leukemia 2013. 27, 2165–2176). Интересно, что домен SET (Su(var)3–9, энхансер белков zeste и trithorax) в MLL не сохраняется в химерных белках, а заменяется партнером слияния (Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80). Рекрутирование хроматин-модифицирующих ферментов, таких как Dot1L и/или комплекс рTEFb, партнером слияния приводит к более эффективной транскрипции и транскрипционному удлинению целевых генов MLL, включая гены *HOXA* (например, *HOXA9*) и *HOX* кофактор *MEIS1* как наиболее важные. Абберрантная экспрессия этих генов в свою очередь блокирует гематопозитическую дифференцировку и интенсифицирует пролиферацию.

Менин, который кодируется геном множественной эндокринной неоплазии типа 1 (*MEN1*), экспрессируется повсеместно и в основном локализован в ядре. Было показано, что он взаимодействует со множеством белков и, таким образом, участвует во множестве клеточных процессов. Наиболее изученной функцией менина является его роль в качестве онкогенного кофактора белков слияния MLL. Менин взаимодействует с двумя мотивами внутри N-концевого фрагмента MLL, который сохраняется во всех белках слияния, MBM1 (менин-связывающий мотив 1) и MBM2 (Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80). Взаимодействие менин/MLL приводит к формированию новой поверхности взаимодействия для фактора роста, выделяемого из эпителия хрусталика (LEDGF). Хотя MLL напрямую связывается с LEDGF, менин является обязательным для стабильного взаимодействия между MLL и LEDGF и ген-специфического рекрутирования хроматином комплекса MLL посредством PWWP-домена LEDGF (Сермакова et al., Cancer Res 2014. 15, 5139-51; Yokoyma & Cleary, Cancer Cell 2008. 8, 36-46). Более того, во множестве генетических исследований было показано, что менин строго необходим для онкогенной трансформации белками слияния MLL, что указывает на привлекательность взаимодействия менин/MLL как терапевтической мишени. Например, условная делеция *Men1* предотвращает лейкомогенез в клетках-предшественниках костного мозга, эктопически экспрессирующих слияния MLL (Chen et al., Proc Natl Acad Sci 2006. 103, 1018-23). Аналогичным образом генетическое нарушение взаимодействия менина / белков

слияния MLL посредством мутаций с потерей функции подавляет онкогенные свойства белков слияния MLL, блокирует развитие лейкоза *in vivo* и выделяет блокатор дифференцировки MLL-трансформированных лейкобластов. В этих исследованиях также было показано, что менин необходим для поддержания экспрессии гена *HOX* белками слияния MLL (Yokooyama et al., Cell 2005. 123, 207-18). Кроме того, были разработаны ингибиторы взаимодействия менин/MLL на основе малых молекул, указывающие на пригодность этого белок-белкового взаимодействия для разработки лекарственного средства, и также была продемонстрирована эффективность на доклинических моделях AML (Borkin et al., Cancer Cell 2015. 27, 589-602; Cierpicki and Grembecka, Future Med Chem 2014. 6, 447-462). Вместе с наблюдениями того, что менин не является обязательным кофактором MLL1 при нормальном гематопозе (Li et al., Blood 2013. 122, 2039-2046), эти данные подтверждают, что нарушение взаимодействия менин/MLL является перспективным новым терапевтическим подходом для лечения лейкоза с перестройкой MLL и других форм рака с сигнатурой активного гена *HOX/MEIS1*. Например, внутренняя частичная тандемная дупликация (PTD) в пределах 5'-области гена *MLL* представляет собой еще одну существенную аберрацию, которая обнаруживается преимущественно при *de novo* и вторичном AML, а также при синдромах миелоидной дисплазии. Хотя молекулярный механизм и биологическая функция MLL-PTD недостаточно хорошо изучены, новые терапевтические целенаправленные стратегии, воздействующие на взаимодействие менин/MLL, могут также оказаться эффективными при лечении лейкозов, связанных с MLL-PTD. Более того, была продемонстрирована зависимость кастрационно-резистентного рака предстательной железы от взаимодействия менин/MLL (Malik et al., Nat Med 2015. 21, 344-52).

В академической среде белок MLL также известен как гистон-лизин-N-метилтрансфераза 2A (KMT2A) (доступ UniProt № Q03164).

Ингибиторы, мишенью которых является взаимодействие менин-MLL, описаны в нескольких источниках: WO2011029054, J Med Chem 2016, 59, 892-913 описывают получение триенопиримидиновых и бензодиазепиновых производных; WO2014164543 описывает тиенопиримидиновые и тиенопиридиновые производные; *Nature Chemical Biology* March 2012, 8, 277-284 и Ren, J.; et al. *Bioorg Med Chem Lett* (2016), 26(18), 4472-4476 описывают тиенопиримидиновые производные; *J Med Chem* 2014, 57, 1543-1556

описывает гидрокси- и аминометилпиперидиновые производные; *Future Med Chem* 2014, 6, 447-462 приводит обзор малых молекул и пептидомиметических соединений; WO2016195776 описывает производные фууро[2,3-d]пиримидина, 9H-пурина, [1,3]оксазоло[5,4-d]пиримидина, [1,3]оксазоло[4,5-d]пиримидина, [1,3]тиазоло[5,4-d]пиримидина, тиено[2,3-b]пиридина и тиено[2,3-d]пиримидина; WO2016197027 описывает производные 5,6,7,8-тетрагидропиридо[3,4-d]пиримидина, 5,6,7,8-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидина, пиридо[2,3-d]пиримидина и хинолина; и WO2016040330 описывает тиенопиримидиновые и тиенопиридиновые соединения. WO2017192543 описывает пиперидины как ингибитора менина. WO2017112768, 10 WO2017207387, WO2017214367, WO2018053267 и WO2018024602 описывают ингибиторы взаимодействия менин-MLL. WO2017161002 и WO2017161028 описывают ингибиторы менин-MLL. WO2018050686, WO2018050684 и WO2018109088 описывают ингибиторы взаимодействия менин-MLL. WO2018226976 описывает способы и композиции для ингибирования взаимодействия менина с белками MLL. В 15 WO2018175746 приведены способы лечения гематологических злокачественных опухолей и саркомы Юинга. В WO2018106818 и WO2018106820 приведены способы стимуляции пролиферации панкреатических клеток. WO2018153312 раскрывает азапиро соединения, относящиеся к области медицинской химии. WO2017132398 раскрывает способы, включающие приведение в контакт лейкозной клетки, несущей 20 мутацию NPM1, с фармакологическим ингибитором взаимодействия между MLL и менином. WO2019060365 описывает замещенные ингибиторы менин-MLL. WO2020069027 описывает лечение гематологических злокачественных опухолей с ингибиторами менина. Krivtsov et al., *Cancer Cell* 2019. No.6 Vol.36, 660-673 описывает ингибитор менин-MLL.

25

#### ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазапиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (бензолсульфонатной соли): 30



и ее сольватам.

Специалисту в данной области будет понятно, что «и ее сольваты» относится к безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида, а также сольваты безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

В частности, настоящее изобретение относится к безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее гидратам.

В частности, настоящее изобретение относится к бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольватам.

В частности, настоящее изобретение относится к бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее гидратам.

В частности, настоящее изобретение относится к 0,5–2,0 эквивалентам гидрата (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид бис-безилатной соли.

В частности, настоящее изобретение относится к 2,0 эквивалентам гидрата (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид бис-безилатной соли.

Более конкретно настоящее изобретение относится к кристаллической форме А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

5 Более конкретно настоящее изобретение относится к кристаллической форме А с 0,5–2,0 эквивалентов гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

10 Более конкретно настоящее изобретение относится к кристаллической форме А 2,0 эквивалентов гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

15 Безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольват отличается превосходными параметрами химической/физической стабильности, своими физическими свойствами, а также тем фактом, что ее можно выделять в виде стабильного кристаллического твердого вещества.

20 Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей бис-безилатную соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольваты.

25 В настоящем изобретении также приведена фармацевтическая композиция, содержащая, состоящая или по существу состоящая из фармацевтически приемлемого носителя, фармацевтически приемлемого эксципиента и/или фармацевтически приемлемого разбавителя и бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольватов.

30 Также приведены способы получения фармацевтической композиции, содержащей, состоящей из и/или по существу состоящей из смеси бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида

или ее сольватов и фармацевтически приемлемого носителя, фармацевтически приемлемого эксципиента и/или фармацевтически приемлемого разбавителя.

В настоящем изобретении дополнительно приведены способы лечения или облегчения заболеваний, таких как рак, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабета с применением бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольватов.

Настоящее изобретение также относится к применению бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольватов для получения лекарственного средства, причем такое лекарственное средство получают для лечения заболевания, такого как рак, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабет.

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике лейкозов, в частности нуклеофосмин (NPM1)-мутированных лейкозов, например NPM1c.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может обладать улучшенными характеристиками метаболической стабильности.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может иметь более продолжительный период полужизни ( $T_{1/2}$ ) *in vivo*.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может иметь улучшенную пероральную биодоступность.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может уменьшать рост опухоли, например опухолей, в которых происходят перестройки/вариации гена MLL (KMT2A) и/или мутации NPM1.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может обладать улучшенными характеристиками ФД *in vivo* в течение продолжительного периода времени, например ингибирование экспрессии гена-мишени, такого как MEIS1, и повышение регуляции маркера дифференцировки в течение периода по меньшей мере 16 часов.

В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может иметь улучшенный профиль безопасности (например, снижение ингибирования hERG; улучшенная кардиоваскулярная безопасность).

5 В варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением может быть приемлемым для дозировки 1 р/сут. (раз в день).

Настоящее изобретение также относится к применению соединения в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с дополнительным фармацевтическим агентом для применения в лечении или профилактике рака, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабет.

10 Более того, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, характеризующемуся тем, что фармацевтически приемлемый носитель тщательно смешивают с терапевтически эффективным количеством соединения в соответствии с настоящим изобретением.

15 Изобретение также относится к продукту, содержащему соединение в соответствии с настоящим изобретением и дополнительный фармацевтический агент в качестве комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении или профилактике рака, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабет.

20 Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики пролиферативного заболевания клеток у теплокровного животного, которое включает введение указанному животному эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением, как определено в настоящем документе, или фармацевтической композиции или комбинации, как определено в настоящем документе.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольватам для применения в качестве лекарственного средства.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольватам для применения в качестве

5 лекарственного средства.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к кристаллической форме А гидрата безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида для применения в качестве лекарственного

10 средства.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к кристаллической форме А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида для применения в

15 качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к получению бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольватов.

Настоящее изобретение также относится к получению кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

20

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Изложение сущности изобретения, а также последующее подробное описание будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми рисунками. С целью иллюстрации изобретения в графических материалах представлены примеры осуществления изобретения; однако изобретение не ограничено конкретным описанием графических материалов. На графических материалах:

25

На **Фиг. 1** представлена порошковая рентгеновская дифрактограмма (XRPD) кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

30

**Фиг. 2:** исследование эффективности в модели подкожного введения (п/к) Molm-14.

**Фиг. 3:** исследование эффективности в модели диссеминированных OCI-AML3.

На **Фиг. 4** представлена порошковая рентгеновская дифрактограмма (XRPD) промежуточного соединения 234b.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытие сущности изобретения можно оценить в более полной мере, 5  
обращаясь к нижеследующему описанию, включающему следующие определения терминов и заключительные примеры. Следует понимать, что определенные элементы раскрываемого соединения, кристаллической формы А, композиций и способов, 10  
которые для ясности описаны в настоящем документе в контексте отдельных аспектов, могут быть также приведены в комбинации в одном аспекте. В противоположность этому различные элементы раскрываемого соединения, кристаллической формы А, 15  
композиций и способов, которые описаны для краткости в контексте одного аспекта, могут быть также приведены по отдельности или в любой подкомбинации.

Некоторые из количественных выражений, приведенных в настоящем документе, не уточняются с использованием термина «около». Следует понимать, что, 15  
независимо от того, используется ли термин «около» явным образом или нет, предполагается, что каждое приведенное в настоящем документе числовое значение относится к указанному фактическому значению, и также предполагается, что оно 20  
относится к приближению к такому указанному значению, которое можно было бы надлежащим образом оценить на основании средней квалификации в данной области, включая приближения, связанные с условиями проведения эксперимента и/или 25  
условиями измерения для такого указанного значения.

В описании и формуле настоящего описания слова «содержать» и «включать» и их варианты, такие как «содержащий» и «содержит», означают «включая, без 30  
ограничений» и не предусматривают исключения (и не исключают), например, других компонентов.

Для целей настоящего описания термины «кристаллическая форма» и «полиморф» являются синонимами. В настоящем документе приведена информация, характеризующая кристаллические формы. Следует понимать, что определение 35  
конкретной формы может достигаться при использовании любой части характеризующей информации, которую специалист в данной области сочтет достаточной для установления наличия конкретной формы. Например, специалисту в 40  
данной области может быть достаточно даже одного идентифицирующего пика, чтобы установить наличие конкретной формы.

Термин «выделенная форма» относится к соединению, присутствующему в форме, которая отделена от любой смеси с другим (-ими) веществом (-ами), системой растворителей или биологической средой. В варианте осуществления настоящего изобретения кристаллическая форма присутствует в выделенной форме.

5 Термин «комнатная температура» (комн. темп.) относится к температуре от около 15 °С до около 30 °С, в частности от около 20 °С до около 30 °С.

Предпочтительно комнатная температура представляет собой температуру около 25 °С.

10 Если кристаллическая форма определена с помощью одного или более пиков XRPD, указанных в виде углов  $2\theta$  (два тета), подразумевается, что каждое из значений  $2\theta$  означает указанное значение  $\pm 0,2$  градуса два тета, если не указано иное.

Термин «затравка» относится к добавлению кристаллического материала к раствору или смеси, чтобы инициировать кристаллизацию или перекристаллизацию.

15 Предполагается, что используемый в настоящем документе термин «соединение по (настоящему) изобретению» или «соединение в соответствии с (настоящим) изобретением» включает в себя безилатную соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида и ее сольваты или любую ее подгруппу.

20 Безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида может существовать в форме сольвата. «Сольват» может представлять собой сольват с водой (то есть гидрат) или с распространенным органическим растворителем.

25 Безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольват могут быть получены в по существу чистой форме, причем мольный процент примесей в выделенном соединении составляет менее около 5 мольных процентов, предпочтительно менее около 2 мольных процентов, более предпочтительно менее около 0,5 мольного процента, наиболее предпочтительно менее около 0,1 мольного процента. В варианте осуществления настоящего изобретения безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида или ее сольват присутствует в по существу чистой форме.

30

Кристаллическая форма А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида может быть приведена в по существу чистой форме, причем мольный процент примесей в выделенной

5 кристаллической форме составляет менее около 5 мольных процентов, предпочтительно менее около 2 мольных процентов, более предпочтительно менее около 0,5 мольного процента, наиболее предпочтительно менее около 0,1 мольного процента. В варианте осуществления настоящего изобретения гидрат бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-

10 метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида присутствует в по существу чистой форме.

В настоящем документе также приведена кристаллическая форма А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-

15 триазин-6-ил)окси)бензамида в виде смеси с одной или более дополнительных форм (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида, включая другие кристаллические формы, другие солевые формы или их сольваты. Содержание кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-

20 фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида может составлять по меньшей мере конкретный весовой процент. Значения конкретного весового процента включают в себя 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и 99,9%.

25 В настоящем документе также приведен способ получения кристаллической формы, описанной в настоящем документе, включающий стадию перекристаллизации соединения А, причем перекристаллизация включает стадии:

- a) добавления соединения А, или его гидрата, или сольвата к смеси подходящих растворителей в присутствии бензолсульфоновой кислоты и изменения

30 температуры в диапазоне от около 20 °С до температуры кипения растворителя с обратным холодильником;

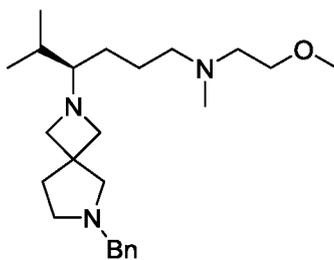
- b) затравки кристаллической формой А;
- c) образование осадка кристаллической формы, описанной в настоящем документе.

В частности, смесь подходящих растворителей в способе, описанном в предыдущем абзаце, представляет собой смесь ацетона, воды и IPAc.

В частности, смесь подходящих растворителей в способе, описанном в предыдущем абзаце, представляет собой смесь изопропанола, воды и IPAc. В частности,

5 температура, используемая в способе, составляет около 25 °C.

Также приведена кристаллическая форма

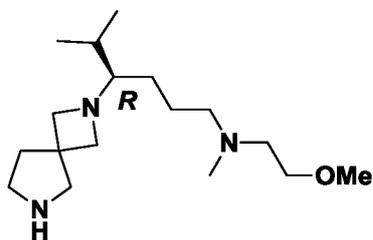


соли лимонной кислоты

причем такая кристаллическая форма дает порошковую рентгеновскую дифрактограмму, содержащую пики при 5,82, 10,09 и 18,42 градуса два тета

10  $\pm 0,2$  градуса два тета; в частности, при этом порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит пики при 5,82, 8,52, 9,20, 10,09, 11,43, 13,61, 14,94, 15,89, 17,03 и 18,42 градуса два тета  $\pm 0,2$  градуса два тета.

Также приведено следующее промежуточное соединение:

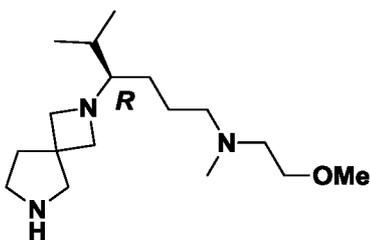


в качестве фармацевтически приемлемой соли или ее

15 сольвата.

Специалисту в данной области будет очевидно, что «или ее сольват» относится к фармацевтически приемлемой соли промежуточного соединения, тем самым включая в себя сольват фармацевтически приемлемой соли.

Также приведено следующее промежуточное соединение:



в качестве сольвата.

20

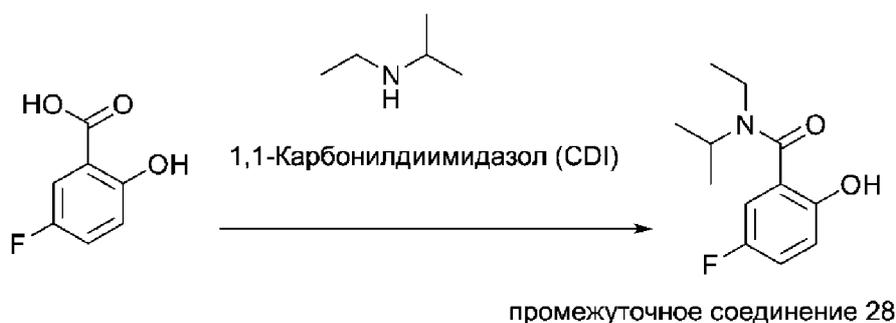
Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Такие соли могут быть образованы с использованием обычных средств, например, путем реакции формы свободной кислоты или формы свободного основания с одним или более эквивалентами соответствующей кислоты или основания, необязательно в растворителе, или в среде, в которой соль является нерастворимой, с последующим удалением указанного растворителя или указанной среды посредством стандартных способов (например, в вакууме, посредством сублимационной сушки или фильтрования). Соли также можно получить путем обмена противоионов соединения по настоящему изобретению в форме соли с другим противоионом, например с использованием приемлемой ионообменной смолы.

Подходящие кислоты включают, например, неорганические кислоты, такие как галогенводородные кислоты, например хлористоводородную или бромистоводородную кислоту, серную, азотную, фосфорную и т. п. кислоты; или органические кислоты, такие как, например, уксусная, пропановая, гидроксипропановая, молочная, пировиноградная, щавелевая (т. е. этандионовая), малоновая, янтарная (т. е. бутандионовая), малеиновая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, цикламовая, салициловая, п-аминосалициловая, палмовая и т. п. кислоты. И наоборот, указанные солевые формы можно преобразовать в форму свободного основания посредством обработки приемлемым основанием.

Подходящие формы солей с основаниями включают, например, соли аммония, соли щелочных и щелочноземельных металлов, например соли лития, натрия, калия, цезия, магния, кальция и т. п., соли с органическими основаниями, например первичными, вторичными и третичными алифатическими и ароматическими аминами, такими как метиламин, этиламин, пропиламин, изопропиламин, четыре изомера бутиламина, диметиламин, диэтиламин, диэтаноламин, дипропиламин, диизопропиламин, ди-н-бутиламин, пирролидин, пиперидин, морфолин, триметиламин, триэтиламин, трипропиламин, хинуклидин, пиридин, хинолин и изохинолин; бензатин, N-метил-D-глюкамин, соли гидрамина и соли аминокислот, таких как, например, аргинин, лизин и т. п. И наоборот, солевые формы посредством обработки кислотой можно превратить в форму свободной кислоты.

Термин сольват включает формы присоединения растворителя. Примерами таких форм присоединения растворителя являются, например, гидраты, алкоголяты и тому подобное.

Также приведено одностадийное преобразование 5-фтор-2-гидроксибензойной кислоты в N-этил-5-фтор-2-гидрокси-N-изопропилбензамид (промежуточное соединение 28):



Эту реакцию выполняют в присутствии связывающего агента CDI в подходящем растворителе, таком как THF, толуол, ацетонитрил или 2-метилтетрагидрофуран. В частности, растворителем представляет собой THF. Реакцию обычно выполняют при температуре в диапазоне от 0 °С до температуры кипения с обратным холодильником, предпочтительно от 0 °С до 50 °С, более предпочтительно от 10 °С до 30 °С, еще более предпочтительно от 15 °С до 25 °С.

«Фармацевтически приемлемый» означает одобренный или подлежащий одобрению законодательным учреждением федерального правительства или правительства штата или соответствующего учреждения в странах помимо США или приведенный в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеях с целью использования для животных и, в частности, для человека.

Термин «субъект» обозначает животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, являющегося объектом лечения, наблюдения или эксперимента.

В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество активного соединения или фармацевтического агента, вызывающее биологический или медицинский ответ со стороны системы тканей животного или человека, который ожидается исследователем, ветеринаром, врачом или иным медицинским работником и который включает в себя ослабление или отмену симптомов заболевания или расстройства, подлежащего лечению.

Подразумевается, что термин «композиция» охватывает продукт, содержащий установленные ингредиенты в установленных количествах, а также любой продукт, который можно получать прямо или косвенно из комбинаций установленных ингредиентов в установленных количествах.

5 Если не указано иное, в настоящем документе термин «влиять» или «подверженный влиянию» (когда речь идет о заболевании, синдроме, состоянии или расстройстве, зависящем от ингибирования ингибитора белок-белкового взаимодействия менин/MLL) включает в себя снижение частоты и/или степени тяжести одного или более симптомов или проявлений указанного заболевания, синдрома, 10 состояния или расстройства; и/или включает в себя профилактику развития одного или более симптомов или проявлений указанного заболевания, синдрома, состояния или расстройства, или развития заболевания, состояния, синдрома или расстройства.

Подразумевается, что в контексте данного документа термин «лечение» относится ко всем процессам, при которых может происходить замедление, 15 прерывание, остановка или прекращение прогрессирования расстройства или смягчение одного или более его симптомов, но не обязательно указывает на полное устранение всех симптомов.

#### Экспериментальная часть

20 Синтез кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида

**Таблица 1. Сокращения**

<b>Сокращение</b>	<b>Значение</b>
<b>Ag(Phen)<sub>2</sub>OTf</b>	комплекс трифлата серебра — бис(1,10-фенантролина)
<b>2-MeTHF</b>	2-метилтетрагидрофуран
<b>ACN или MeCN</b>	ацетонитрил
<b>AcCl</b>	ацетилхлорид
<b>AcOH</b>	уксусная кислота
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	уксусный ангидрид
<b>водн.</b>	водный
<b>Ar</b>	аргон
<b>BBr<sub>3</sub></b>	трибромборан

<b>Сокращение</b>	<b>Значение</b>
<b>bn</b>	бензил
<b>Boc</b>	<i>трет</i> -бутилоксикарбонил
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	ди- <i>трет</i> -бутилдикарбонат
<b><i>n</i>-BuLi</b>	<i>n</i> -бутиллитий
<b>Cbz</b>	бензилоксикарбонил
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	метанол-d <sub>4</sub>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	хлороформ
<b>Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	карбонат цезия
<b>конц.</b>	концентрированный
<b>DBU</b>	1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
<b>DCC</b>	дициклогексилкарбодимид
<b>DCE</b>	дихлорэтан
<b>DCM</b>	дихлорметан
<b>DDQ</b>	4,5-дихлор-3,6-диоксоциклогекса-1,4-диен-1,2-дикарбонитрил
<b>DEA</b>	диэтиламин
<b>DIBAL-H</b>	диизобутилалюминия гидрид
<b>DIEA или DIPEA</b>	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
<b>DMAP</b>	<i>N,N</i> -диметилпиридин-4-амин
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -диметилформаид
<b>DMP</b>	периодинан Десса — Мартина
<b>DMSO</b>	диметилсульфоксид
<b>dppf</b>	1,1'-ферроцендиил-бис(дифенилфосфин)
<b>EDCI</b>	<i>N</i> -(3-диметиламинопропил)- <i>N'</i> -этилкарбодимида гидрохлорид
<b>EA или EtOAc</b>	этилацетат
<b>EtOH</b>	этанол
<b>экв.</b>	эквивалент (-ы)
<b>FA</b>	муравьиная кислота
<b>КФХ</b>	колоночная флэш-хроматография
<b>ч</b>	час (-ы)
<b>H<sub>2</sub></b>	водород

Сокращение	Значение
<b>НАТУ</b>	1-[бис(диметиламино)метилен]-1 <i>H</i> -1,2,3-триазоло[4,5- <i>b</i> ]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат
<b>H<sub>2</sub>O</b>	вода
<b>HCl</b>	хлористоводородная кислота
<b>HOBT</b>	1-гидроксибензотриазол
<b>ВЭЖХ</b>	высокоэффективная жидкостная хроматография
<b>ICH<sub>2</sub>Cl</b>	хлорйодметан
<b>IPA</b>	изопропиловый спирт
<b>IPAc</b>	изопропилацетат
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	карбонат калия
<b>KI</b>	йодид калия
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	дикалийфосфат
<b>K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	трикалийфосфат
<b>LiAlD<sub>4</sub></b>	лития алюмодейтерид
<b>ЛАГ</b>	лития алюмогидрид
<b>LiBH<sub>4</sub></b>	боргидрид лития
<b>LDA</b>	диизопропиламид лития
<b>LiCl</b>	хлорид лития
<b>LG</b>	уходящая группа
<b>Me</b>	метил
<b>MeOH</b>	метанол
<b>2-MeTHF</b>	2-метилтетрагидрофуран
<b>мин</b>	минута (-ы)
<b>мл</b>	миллилитры
<b>ммоль</b>	миллимоли
<b>мг</b>	миллиграмм
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	сульфат магния
<b>MSA</b>	метансульфовая кислота
<b>MsCl</b>	метансульфонилхлорид
<b>МС</b>	молекулярное сито
<b>MTBE</b>	метил <i>трет</i> -бутиловый эфир
<b>N<sub>2</sub></b>	азот

<b>Сокращение</b>	<b>Значение</b>
<b>H/П</b>	неприменимо
<b>NaBH<sub>3</sub>CN</b>	цианоборгидрид натрия
<b>NaBH(OAc)<sub>3</sub></b>	триацетоксиборгидрид натрия
<b>NaBD<sub>3</sub>CN</b>	цианобордейтерид натрия
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	карбонат натрия
<b>NaH</b>	гидрид натрия
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	бикарбонат натрия
<b>NaI</b>	йодид натрия
<b>NaOAc</b>	ацетат натрия
<b>NaOH</b>	гидроксид натрия
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	сульфит натрия
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	сульфат натрия
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	хлорид аммония
<b>NMM</b>	1–4-метилморфолин
<b>Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub></b>	трис(добензилиденацетон)дипалладий (0)
<b>Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·DCM</b>	комплекс [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия (II) с дихлорметаном
<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	тетракис(трифенилфосфин)палладий (0)
<b>PE</b>	петролейный эфир
<b>PG</b>	защитная группа
<b>Phen</b>	фенантролин
<b>фунты/кв. дюйм</b>	фунты на квадратный дюйм
<b><i>p</i>-TsOH</b>	<i>p</i> -толуолсульфоновая кислота
<b><i>p</i>-TsOH·H<sub>2</sub>O</b>	моногидрат <i>p</i> -толуолсульфоновой кислоты
<b>R<sub>t</sub></b>	время удерживания
<b>сегнетова соль</b>	тетрагидрат тартрата калия-натрия
<b>Комн. темп.</b>	комнатная температура
<b>насыщ.</b>	насыщенный
<b>СФХ</b>	сверхкритическая флюидная хроматография
<b>TBAF</b>	фторид тетрабутиламмония

<b>Сокращение</b>	<b>Значение</b>
<b>TBDMS</b>	<i>трет</i> -бутилдиметилсилил
<b>TBDPS</b>	<i>трет</i> -бутилдифенилсилил
<b><i>t</i>-BuOK</b>	<i>трет</i> -бутоксид калия
<b>TEA</b>	триэтиламин
<b>Tf</b>	трифторметансульфонил
<b>TFA</b>	трифторуксусная кислота
<b>THF</b>	тетрагидрофуран
<b>Ti(OiPr)<sub>4</sub></b>	изопропоксид титана (IV)
<b>TCX</b>	тонкослойная хроматография
<b>TMEDA</b>	<i>N,N,N',N'</i> -тетраметилэтилендиамин
<b>TMG</b>	1,1,3,3-тетраметилгуанидин
<b>TMSI</b>	йодтриметилсилан
<b>Ts</b>	<i>n</i> -толуолсульфонил
<b>TsCl</b>	<i>n</i> -тлуолсульфонилхлорид
<b>об./об.</b>	объем на объем
<b>об.</b>	объем (-ы)
<b>масс.</b>	масса
<b>Xantphos</b>	4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен

Квалифицированному специалисту будет понятно, что, даже если это не указано явно в экспериментальных протоколах ниже, как правило, после очистки посредством колоночной хроматографии собирали необходимые фракции и выпаривали растворитель.

Если стереохимия не указана, это означает, что это смесь стереоизомеров, если не указано иное или не ясно из контекста.

Если стереоцентр обозначен «RS», это означает, что в указанном центре была получена рацемическая смесь, если не указано иное.

Как будет понятно специалисту в данной области, соединения и промежуточные соединения, синтезированные с использованием указанных протоколов, могут существовать в форме сольвата, например гидрата, и/или содержать остаточный растворитель или незначительные примеси. Соединения или промежуточные

соединения, выделенные в форме соли или сольватов (например, гидратов), могут представлять собой целочисленные стехиометрические, то есть моно- или дисоли, или промежуточную стехиометрическую форму. Если промежуточное соединение или соединение обозначено как «соль HCl» без указания количества эквивалентов HCl, это  
 5 означает, что количество эквивалентов HCl не определено. Если промежуточное соединение или соединение обозначено как «гидрат» без указания количества эквивалентов H<sub>2</sub>O, это означает, что количество эквивалентов H<sub>2</sub>O не определено.

Для удобства (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-  
 10 триазин-6-ил)окси)бензамид (свободное основание) в экспериментальной части ниже обозначается как «соединение А».

**Пример 1. Синтез (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-  
 15 триазин-6-ил)окси)бензамида (соединение А) — способ получения А**

**Получение промежуточного соединения 1**

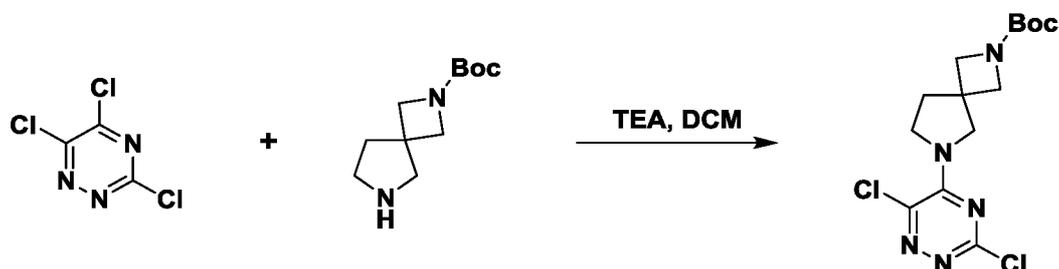
***трет*-бутил(5-метил-4-оксогексил)карбамат**



К раствору *трет*-бутил 2-оксопирролидин-1-карбоксилата (5,0 г, 27 ммоль) и TMEDA (5,0 мл, 33 ммоль) в THF (60 мл), охлажденного при -70 °С, медленно добавляли  
 20 раствор изопропилмагния бромида (19 мл, 55 ммоль, 2,9 М в 2-метилтетрагидрофуране), полученную смесь медленно нагревали до комн. темп. и перемешивали в течение 12 ч. Смесь выливали в насыщ. водн. NH<sub>4</sub>Cl (50 мл) и экстрагировали с использованием EtOAc (50 мл x 3 раза). Объединенные органические  
 25 слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который дополнительно очищали методом КФХ (PE/EtOAc = от 1 : 0 до 100 : 1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (3,7 г, 60% выход) в виде желтого масла.

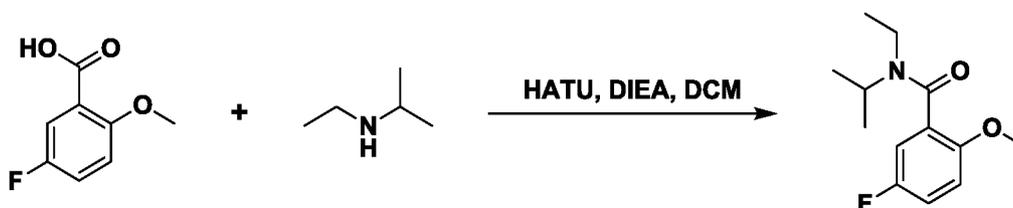
### Получение промежуточного соединения 13

#### *tert*-бутил 6-(3,6-дихлор-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилат



- 5 К раствору 3,5,6-трихлор-1,2,4-триазина (10,0 г, 54,2 ммоль) и TEA (15,2 мл, 109 ммоль) в DCM (100 мл), охлажденного при 0 °С, добавляли *tert*-бутил 2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилат (9,21 г, 43,4 ммоль), смесь нагревали до комн. темп. и перемешивали в течение 1 ч. Смесь разводили водой (20 мл) и экстрагировали DCM (30 мл x 3 раза). Объединенные органические слои промывали солевым
- 10 раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством КФХ на силикагеле (PE/EtOAc = от 1 : 0 до 3 : 1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (12,0 г, 58% выход) в виде желтого твердого вещества.
- промежуточного соединения 27**

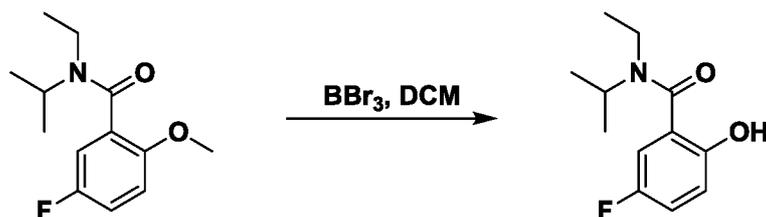
#### 15 *N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-метоксибензамид



- К смеси 5-фтор-2-метоксибензойной кислоты (8,00 г, 47,0 ммоль) и *N*-этилпропан-2-амин (8,19 г, 94,0 ммоль) в сухом DCM (150 мл), охлажденной при 0 °С, медленно по частям добавляли HATU (21,5 г, 56,5 ммоль) и DIEA (9,10 г, 70,4 ммоль). Полученную
- 20 смесь медленно нагревали до комн. темп. и перемешивали в течение 8 ч. Органический слой промывали водой (20 мл x 3 раза) и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После фильтрации растворитель удаляли при пониженном давлении и неочищенный продукт очищали с помощью КФХ (EtOAc/PE = от 0% до 20%) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (12,0 г, выход 96%) в виде белого твердого
- 25 вещества.

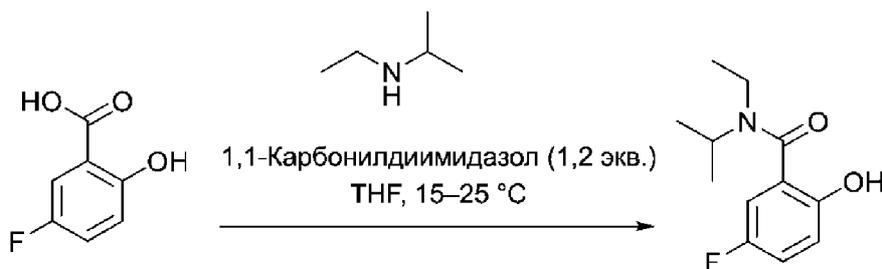
## Получение промежуточного соединения 28

### *N*-этил-5-фтор-2-гидрокси-*N*-изопропилбензамид



К раствору *N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-метоксибензамида (**промежуточное**  
**соединение 27**) (12,0 г, 50,1 ммоль) в сухом DCM (100 мл), охлажденному при -78 °С,  
 5 медленно добавляли BBr<sub>3</sub> (14,4 мл, 152 ммоль), полученную смесь медленно нагревали  
 до комн. темп. и перемешивали в течение 8 ч. Смесь снова охлаждали до -78 °С и по  
 каплям добавляли MeOH (5 мл) для гашения реакции. Полученную смесь медленно  
 нагревали до комн. темп. и доводили значение pH до около 8 посредством добавления  
 10 насыщ. водн. раствора NaHCO<sub>3</sub>. Водный слой экстрагировали DCM (50 мл x 3 раза) и  
 объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и  
 концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта,  
 который очищали с помощью КФХ (EtOAc/PE = от 0% до 20%) с получением  
 15 указанного в заголовке промежуточного соединения (9,0 г, выход 78%) в виде белого  
 твердого вещества.

### Альтернативный способ получения промежуточного соединения 28

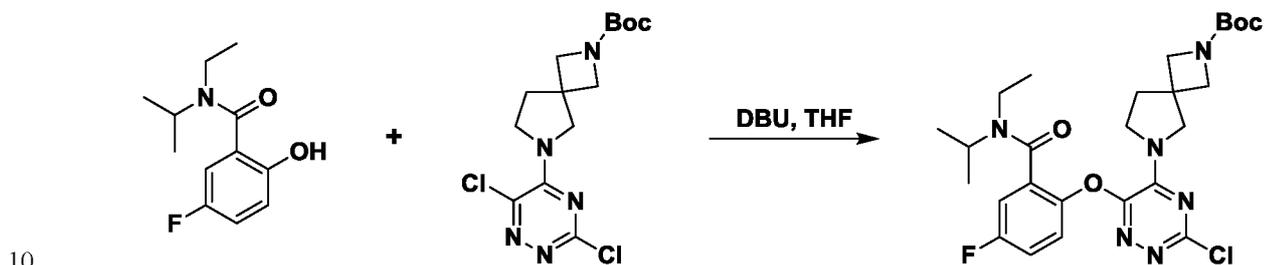


Смесь 5-фтор-2-гидроксибензойной кислоты (14,0 кг, 89,68 моль, 1,0 экв.) в THF (168 л,  
 12 объемов) доводили до 15–25 °С и добавляли 1,1-карбонилдиимидазол (17,45 кг,  
 20 107,62 моль, 1,2 экв.) в течение 1 часа. После добавления смесь перемешивали в  
 течение 18 часов при 15–25 °С. После этого к смеси добавляли *N*-этилпропан-2-амин  
 (14,85 кг, 170,39 моль, 1,9 экв.) при 15–25 °С в течение 2 часов. Полученную смесь  
 дополнительно выдерживали в течение 18–24 часов при 15–25 °С. pH доводили до  
 значения 4–5 с помощью водн. 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (140 кг, 10 объемов) и слои разделяли.  
 25 Органическую фазу концентрировали до 42–56 л, поддерживая температуру ниже  
 40 °С, а впоследствии к смеси добавляли *n*-гептан (43 кг, 4,5 объема) при 15–25 °С в

течение 3 часов. Впоследствии смесь охлаждали до 0–10 °С и перемешивали в течение дополнительных 6 часов. Полученную суспензию фильтровали и осадок промывали смесью трет-бутилметилового эфира (МТВЕ) и н-гептана (25 кг смеси МТВЕ : н-гептан 2 : 3 об./об., 2,5 объема). Промывку осадка повторяли еще два раза и полученное  
 5 твердое вещество сушили в вакууме при 50 °С, чтобы получить промежуточное соединение 28 (16,5 кг, чистота: 99,1%, выход: 80,4%).

#### Получение промежуточного соединения 14

#### *tert*-бутил 6-(3-хлор-6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилат

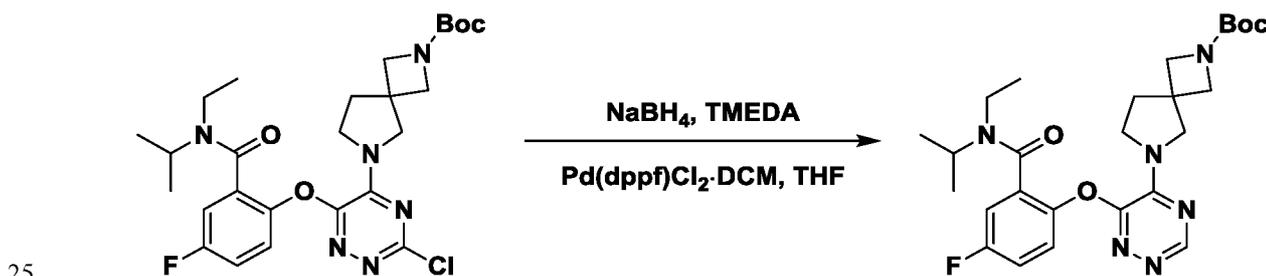


Смесь *tert*-бутил 6-(3,6-дихлор-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 13**) (12,0 г, 33,3 ммоль), *N*-этил-5-фтор-2-гидрокси-*N*-изопропилбензамида (**промежуточное соединение 28**) (7,5 г, 33,3 ммоль) и DBU (6,1 г, 40,1 ммоль) в THF (120 мл) перемешивали при 25 °С в течение 8 ч. Смесь  
 15 разводили водой (30 мл) и экстрагировали DCM (30 мл x 3 раза). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством КФХ (PE/EtOAc = от 1 : 0 до 3 : 1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (14,0 г, 73% выход) в виде  
 20 зеленого твердого вещества.

#### Получение промежуточного соединения 2

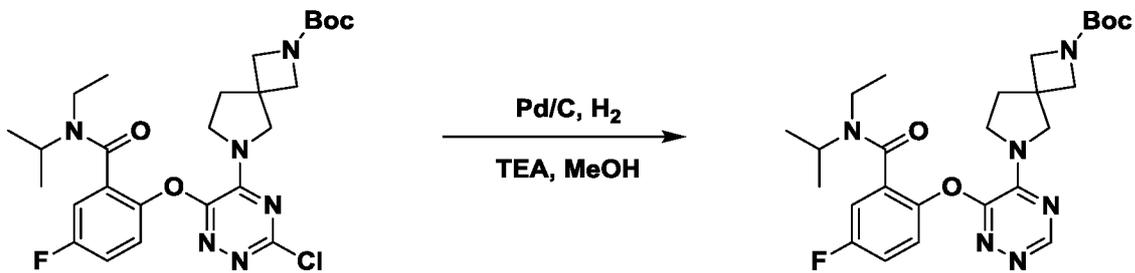
#### *tert*-бутил 6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилат

Способ А синтеза для промежуточного соединения 2



К смеси *tert*-бутил 6-(3-хлор-6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 14**) (20 г, 36,4 ммоль), NaBH<sub>4</sub> (2,48 г, 65,7 ммоль) и TMEDA (8,54 г, 73,5 ммоль) в THF (500 мл) добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·DCM (1,70 г, 2,08 ммоль) в атмосфере N<sub>2</sub>. После добавления реакцию смесь перемешивали при 25 °С в течение 14 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали, остаток очищали с помощью КФХ на силикагеле (EtOAc) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (15 г, чистота 93%, выход 74%) в виде коричневого твердого вещества.

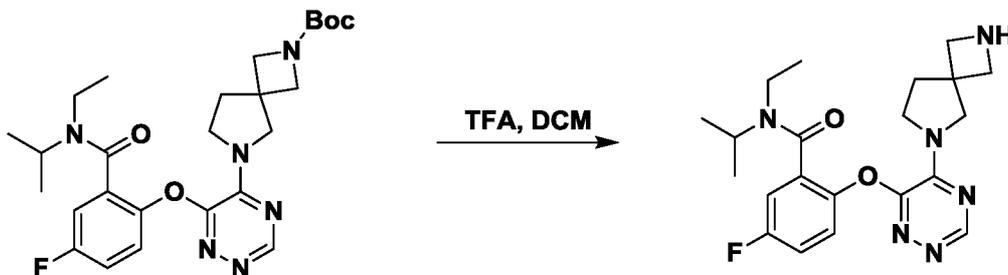
Способ В синтеза для промежуточного соединения 2



К раствору *tert*-бутил 6-(3-хлор-6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 14**) (22,0 г, 40,1 ммоль), TEA (15 мл) в MeOH (100 мл) добавляли Pd/C (влажный, 5,0 г, 10%), полученную смесь перемешивали в атмосфере H<sub>2</sub> (30 фунтов/кв. дюйм) при 25 °С в течение 8 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (25,0 г, неочищенное), которое использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

### Получение промежуточного соединения 3

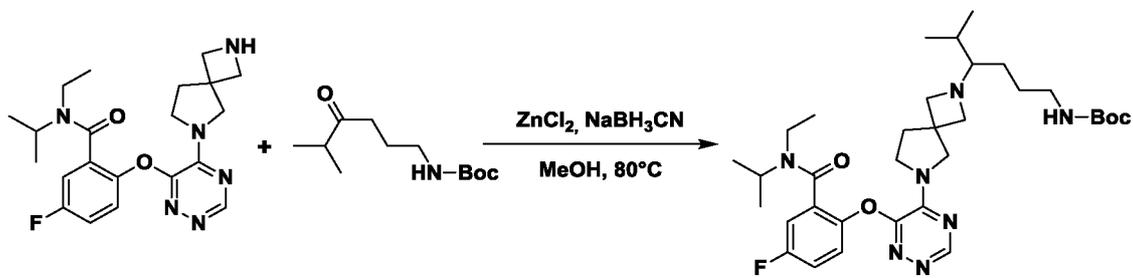
**2-((5-(2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропилбензамид**



К раствору *трет*-бутил 6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-карбоксилата (**промежуточное соединение 2**) (300 мг, 0,583 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли TFA (0,5 мл, 6,4 ммоль), полученную смесь перемешивали при комн. темп. в течение 3 ч. Впоследствии в смесь медленно добавляли 10% раствор NaOH (5 мл) для доведения значения pH до около 12, полученную смесь экстрагировали DCM (10 мл x 3 раза). Объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (220 мг, 90% выход) в виде белого твердого вещества.

### 10 Получение соединения 61

*трет*-бутил-бутил (4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-diazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)карбамат



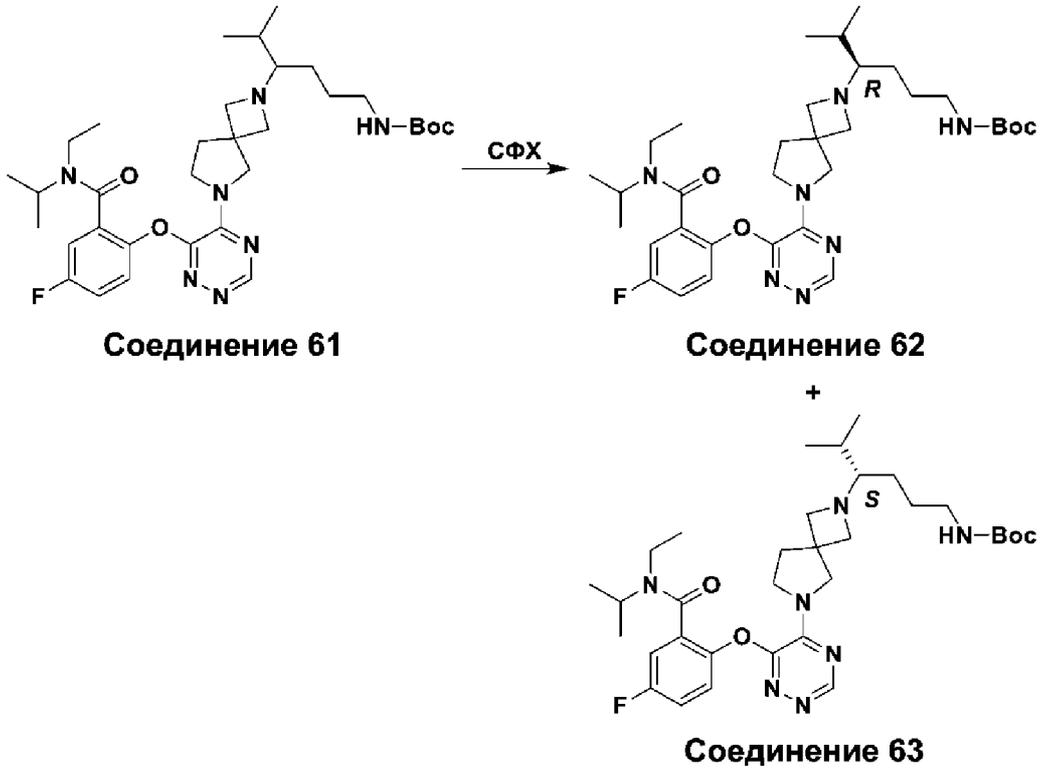
Смесь 2-((5-(2,6-diazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропилбензамида (**промежуточное соединение 3**) (1,0 г, 2,4 ммоль), *трет*-бутил(5-метил-4-оксогексил)карбамата (**промежуточное соединение 1**) (830 мг, 3,62 ммоль) и ZnCl<sub>2</sub> (660 мг, 4,84 ммоль) в MeOH (15 мл) перемешивали при 80 °C в течение 0,5 ч. Впоследствии добавляли NaBH<sub>3</sub>CN (310 мг, 4,93 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 80 °C в течение 6 ч. После охлаждения до комн. темп. смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который дополнительно очищали препаративной ВЭЖХ с использованием Waters Xbridge Prep OBD (колонка: C18 150 x 40 мм 10 мкм; элюент: ACN/H<sub>2</sub>O (0,05% аммиак) от 45% до 75% об./об.) с получением указанного в заголовке соединения (700 мг, выход 46%) в виде бесцветного масла.

### Получение соединений 62 и 63

*трет*-бутил (*R*)-(4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)карбамат

*трет*-бутил (*S*)-(4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)карбамат

5



*трет*-бутил(4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)карбамат (**соединение 61**) (200 мг, 0,319 ммоль) очищали посредством СФХ на DAICEL CHIRALPAK IG (колонка: 250 x 30 мм, 10 мкм; изократическое элюирование: EtOH (содержащий 0,1% 25% аммиака) : сверхкритический CO<sub>2</sub>, 40% : 60% (об./об.), чтобы получить указанные в заголовке соединения (**соединение 62**) (85 мг, выход 42%) и (**соединение 63**) (80 мг, выход 40%) в обоих случаях в виде светло-желтого масла.

10

## Соединение 64

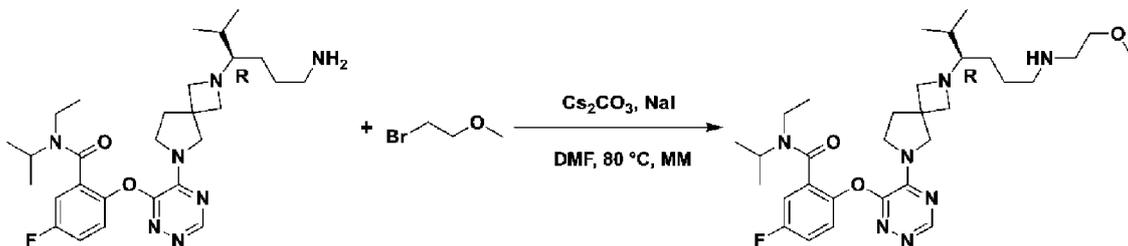
**(R)-2-((5-(2-(6-амино-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-N-этил-5-фтор-N-изопропилбензамид**



- 5 К раствору *трет*-бутил (R)-4-(6-(6-(2-(этил (изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро [3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)карбамата (соединение 62) (550 мг, 0,876 ммоль) в DCM (4 мл) медленно добавляли TFA (4 мл) и полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток разводили DCM (40 мл) и доводили значение pH до приблизительно 12 водным раствором NaOH (2 М, 16 мл). Водный слой экстрагировали с помощью DCM (10 мл x 2). Объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (460 мг, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без
- 10
- 15 дополнительной очистки.

## Соединение 11

**(R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид**



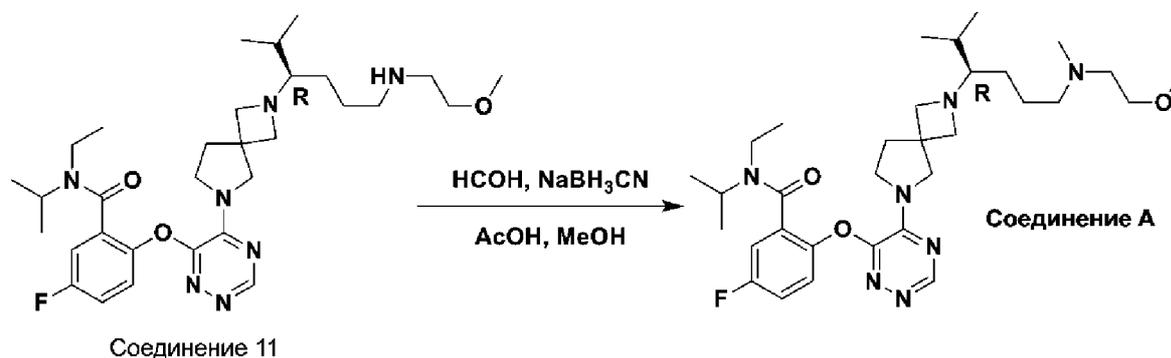
- 20 Смесь (R)-2-((5-(2-(6-амино-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-N-этил-5-фтор-N-изопропилбензамида (соединение 64) (120 мг, неочищенный), 1-бром-2-метоксиэтана (32 мг, 0,23 ммоль), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (222 мг, 0,681 ммоль), NaI (102 мг, 0,680 ммоль) в DMF (1 мл) перемешивали при 80 °С
- 25 посредством микроволнового излучения в течение 1 ч. После охлаждения до комн.

температура смесь разводили H<sub>2</sub>O (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3 x 10 мл). Объединенные органические слои промывали H<sub>2</sub>O (10 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который дополнительно очищали посредством ВЭЖХ на Phenomenex Gemini-NX (колонка: 150 x 30 мм, 5 мкм; элюент: ACN/H<sub>2</sub>O (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) от 51% до 71% (об./об.) и дополнительно очищали с помощью СФХ на DAICEL CHIRALCEL OD-H (колонка: 250 x 30 мм, 5 мкм; элюент: сверхкритический CO<sub>2</sub> в EtOH (0,1% об./об. аммиака) 25/25, об./об.) с получением указанного в заголовке соединения (5,13 мг, чистота 96%) в виде желтого твердого вещества.

ЖХ-МС (ИЭР) (способ 1): R<sub>t</sub> = 2,997 мин, полученное значение m/z: 586,3 [M+H]<sup>+</sup>.

### Соединение А

**(R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид**



Смесь (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси) бензамида (соединение 11) (40,0 мг, 0,068 ммоль), формальдегида (55,4 мг, 0,683 ммоль, 37% в воде) и AcOH (8,2 мг, 0,137 ммоль) в безводном MeOH (2 мл) перемешивали при 45 °С в течение 1 ч. Впоследствии к смеси добавляли NaBH<sub>3</sub>CN (8,6 мг, 0,137 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 45 °С в течение еще 1 ч. После охлаждения до комн. темп. реакцию смесь обрабатывали насыщ. водн. NaHCO<sub>3</sub> (40 мл) для доведения значения pH до около 8 и дополнительно экстрагировали DCM (20 мл x 3 раза). Объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением с получением неочищенного продукта, который очищали препаративной ВЭЖХ на Boston Prime (колонка: C18 150 x 30 мм, 5

мкм, подвижная фаза А: H<sub>2</sub>O (0,04% аммиака + 10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), подвижная фаза В: АСN, скорость потока: 25 мл/мин, градиентное условие В/А от 50% до 80% (50% В до 80% В)) с получением указанного в заголовке соединения (9,62 мг, чистота 99,10%, выход 23,3%) в виде желтого масла.

5

**Пример 2. Синтез (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (соединение А) — способ получения В**

**Получение промежуточного соединения 7**

10 **4-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)бутановая кислота**



К раствору гидрохлорида 4-(метиламино)бутановой кислоты (3,0 г, 19,5 ммоль) и ТЕА (7,78 мл, 58,6 ммоль) в MeOH (30 мл) по каплям добавляли Boc<sub>2</sub>O (4,69 г, 21,5 ммоль). Смесь перемешивали при комн. темп. в течение 2 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток разводили EtOAc (100 мл), промывали охлажденным 0,1 н. HCl (70 мл x 2), H<sub>2</sub>O (50 мл x 2) и соевым раствором (50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (1,80 г, неочищенное) в виде бесцветного масла.

15

20 **Получение промежуточного соединения 8**

**трет-бутил (4-(метокси(метил)амино)-4-оксобутил)(метил)карбамат**



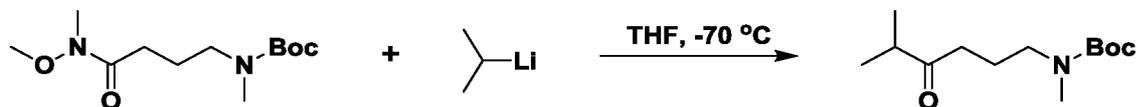
К раствору 4-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)бутановой кислоты (**промежуточное соединение 7**) (1,80 г, неочищенное) в CHCl<sub>3</sub> (30 мл) добавляли N,O-диметилгидроксиламина гидрохлорид (960 мг, 9,84 ммоль), HOBT (1,24 г, 9,18 ммоль) и NMM (2,80 мл, 25,1 ммоль). Впоследствии добавляли EDCI (2,23 г, 11,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комн. темп. в течение 4 ч. Реакционную смесь разводили DCM (100 мл), промывали 1 н. HCl (30 мл x 3), насыщ. водн. NaHCO<sub>3</sub> (30 мл x 3) и соевым раствором (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в условиях вакуума с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (1,70 г, неочищенное) в виде бесцветного масла.

25

30

### Получение промежуточного соединения 9

#### *трет*-бутилметил(5-метил-4-оксогексил)карбамат

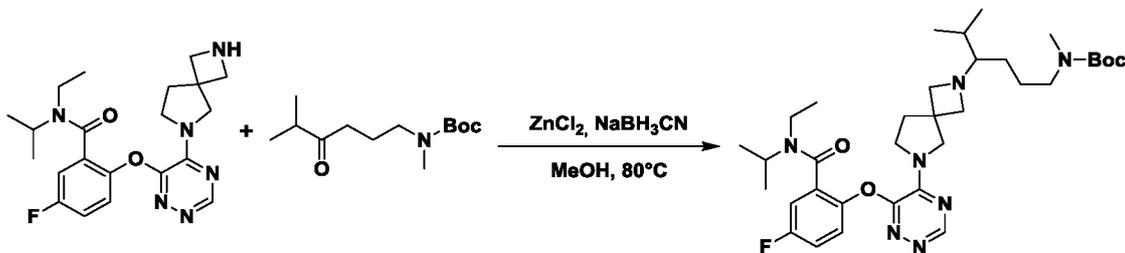


- 5 К раствору *трет*-бутил(4-(метокси(метил)амино)-4-оксобутил)(метил)карбамата (**промежуточное соединение 8**) (200 мг, неочищенное) в THF (5 мл), охлажденному при -70 °С, в атмосфере N<sub>2</sub> добавляли по каплям изопропиллитий (3,2 мл, 2,24 ммоль, 0,7М в пентане). Полученную смесь перемешивали при -70 °С в течение 2 ч. Смесь гасили с использованием насыщ. водн. NH<sub>4</sub>Cl (15 мл), экстрагировали EtOAc
- 10 (30 мл × 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью КФХ (PE/EtOAc = 10 : 1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (60 мг) в виде бесцветного масла.

15

### Получение соединения 60

#### *трет*-бутил(4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)(метил)карбамат



20

К раствору 2-((5-(2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропилбензамида (**промежуточное соединение 3**) (600 мг, 1,45 ммоль) и *трет*-бутил-метил(5-метил-4-оксогексил)карбамата (**промежуточное соединение 9**) (330 мг, 1,37 ммоль) в MeOH (50 мл) добавляли ZnCl<sub>2</sub> (789 мг, 5,79 ммоль).

- 25 Полученную смесь перемешивали при 80 °С в течение 2 ч. Впоследствии добавляли NaBH<sub>3</sub>CN (729 мг, 11,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 80 °С в течение ночи. После охлаждения до комн. темп. смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка, который разводили DCM

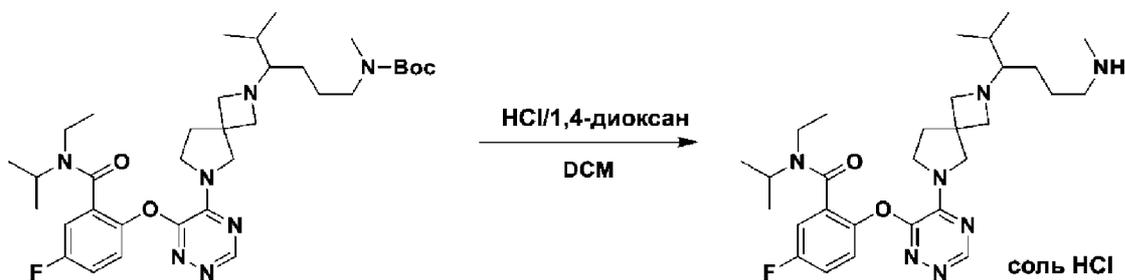
(50 мл), гасили насыщ. водн.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 мл), экстрагировали DCM (50 мл  $\times$  3).

Объединенные органические слои промывали солевым раствором (50 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, а фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали при помощи КФХ

5 (DCM/MeOH = 10 : 1) с получением указанного в заголовке соединения (400 мг, выход 42%) в виде белого твердого вещества.

### Соединение 67

10 *N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(2-метил-6-(метиламино)гексан-3-ил)-2,6-  
дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида гидрохлорид

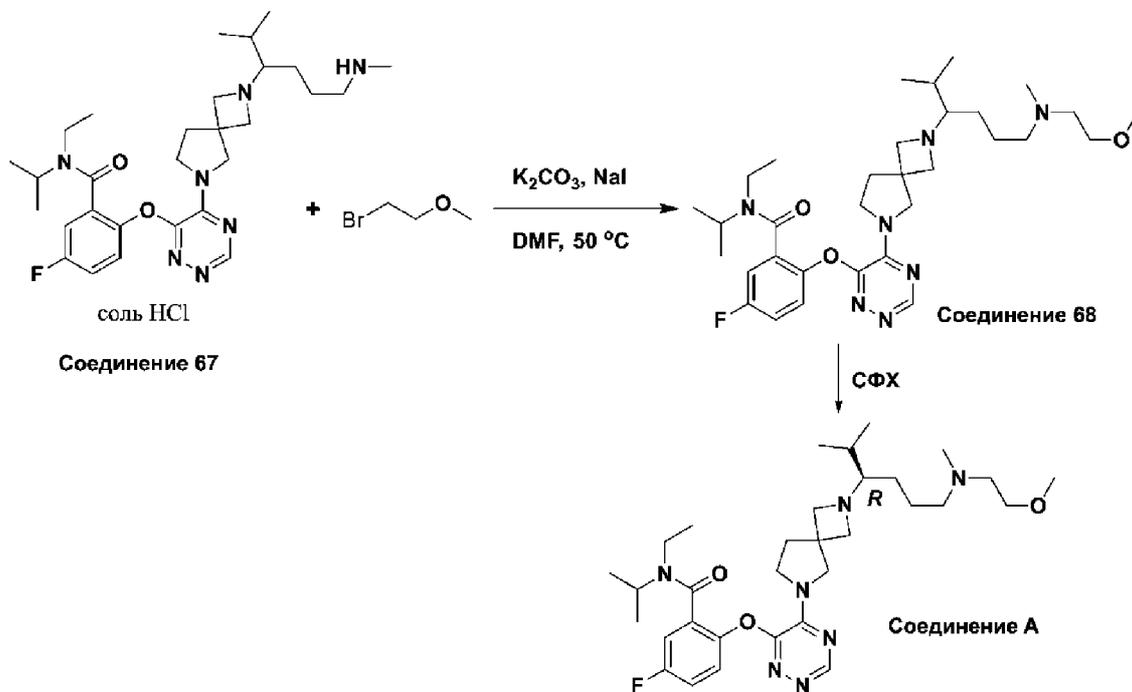


15 К раствору трет-бутил (4-(6-(6-(2-(этил(изопропил)карбамоил)-4-фторфенокси)-1,2,4-  
триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-5-метилгексил)(метил)карбамата  
(соединение 60) (1 г, 1,56 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли 4 М HCl в диоксане (5 мл,  
20 ммоль), полученную смесь перемешивали при комн. темп. в течение 1 ч.

Реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке  
соединения (960 мг, неочищенное, соль HCl), которое использовали непосредственно  
на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Соединение А

**(R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид**



5

К смеси *N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(2-метил-6-(метиламино)гексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид гидрохлорида (**соединение 67**) (480 мг, неочищенное),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (700 мг, 5,07 ммоль) и  $\text{NaI}$  (400 мг, 2,67 ммоль) в  $\text{DMF}$  (5 мл) добавляли 1-бром-2-метоксиэтан (230 мг, 1,65 ммоль).

10 Полученную смесь перемешивали при  $50\text{ }^\circ\text{C}$  в течение ночи. После охлаждения до комн. темп. реакцию гасили  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл) и экстрагировали с использованием  $\text{DCM}$  (30 мл  $\times$  3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл  $\times$  3), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка. Остаток очищали с помощью КФХ ( $\text{DCM}/\text{MeOH} = 10 : 1$ ) с

15 получением *N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (**соединение 68**) (250 мг, выход 48%) в виде желтого масла.

*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси) бензамид (**соединение 68**) (960 мг, в сочетании с несколькими партиями, полученными способом В) сначала

20 разделяли с помощью СФХ с использованием DAICEL CHIRALPAK IG (колонка:

250x30mm 10um; подвижная фаза: А: сверхкритический CO<sub>2</sub>, В: EtOH (0,1% аммиак),  
 А : В = 40 : 60 при 60 мл/мин) и дополнительно очищали с помощью препаративной  
 ВЭЖХ с использованием Boston Prime (колонка: 150 x 30 мм, 5 мкм, подвижная фаза А:  
 H<sub>2</sub>O (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), подвижная фаза В: ACN, скорость потока: 25 мл/мин,  
 5 градиентное условие В/А от 55% до 85%) с получением указанного в заголовке  
 соединения (270 мг) в виде бесцветного масла.

**<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*<sub>4</sub>):** δ = 8,40 (с, 1H), 7,47–7,32 (м, 1H), 7,30–7,10 (м, 2H),  
 4,24–4,01 (м, 2H), 3,89–3,60 (м, 3H), 3,48 (уш. с, 3H), 2,63–2,51 (м, 2H), 2,43–2,32 (м,  
 2H), 2,29–2,07 (м, 6H), 1,86–1,72 (м, 1H), 1,62–1,44 (м, 2H), 1,39–1,02 (м, 10H), 0,99–0,66  
 10 (м, 9H). Некоторые протоны скрыты пиком растворителя и не представлены.

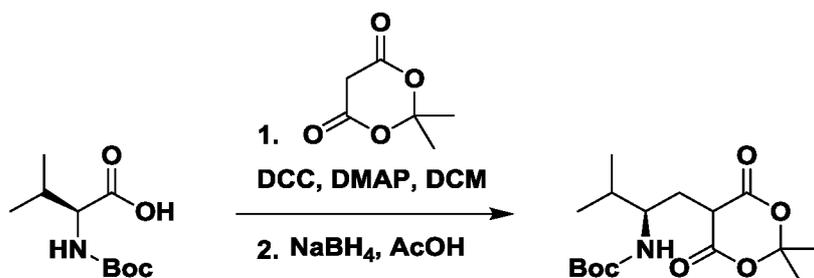
**ЖХМС (ИЭР) (способ 2):** R<sub>t</sub> = 1,965 мин, полученное значение m/z: 600,3 [M+H]<sup>+</sup>.

**СФХ (способ 11):** R<sub>t</sub> = 4,904 мин.

**Пример 3. Синтез (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-  
 15 метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-  
 1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (соединение А) — способ получения С**

**Получение промежуточного соединения 227**

***tert*-бутил (*R*)-(1-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-метилбутан-2-  
 ил)карбамат**



20 Boc-L-валин (44,9 кг), 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (32,9 кг) и DMAP (35,5 кг) в  
 DCM (607 кг), предварительно охлажденный при -10–0 °С, добавляли к раствору DCC  
 (55,5 кг) в DCM (613 кг) в течение 3 ч и выдерживали в течение 16 ч при -10–0 °С.  
 Добавляли 10% водный раствор лимонной кислоты (449 кг) при поддержании  
 25 температуры ниже 10 °С. Полученную суспензию выдерживали в течение 2 ч при  
 0–10 °С, впоследствии фильтровали. Осадок на фильтре промывали DCM (91 кг).  
 Фильтрат отделяли и органический слой промывали 10% водным раствором лимонной  
 кислоты (два раза 450 кг) и 10% водным раствором NaCl (449 кг). К органической фазе  
 (1200 кг) добавляли уксусную кислоту (75,0 кг) при поддержании температуры от -10

до 0 °С. Борогидрид натрия (18,0 кг) добавляли порциями в течение 5 ч, поддерживая температуру в диапазоне от -10 до 0 °С, а впоследствии полученную смесь выдерживали при температуре от -10 до 0 °С в течение еще 16 ч. Смесь нагревали до температуры от 15 до 25 °С и выдерживали в течение 2 ч. Смесь впоследствии промывали 14% водным раствором NaCl (450 кг) с последующим вторым промыванием 14% водным раствором NaCl (432 кг) и конечной промывкой водой (444 кг). Органическую фазу концентрировали при пониженном давлении до 2–4 объемов. К остатку добавляли изо-пропанол (143 кг) и концентрировали до 4–5 объемов при пониженном давлении. После охлаждения до температуры от -10 до 0 °С и выдерживания в течение 8 ч полученную суспензию фильтровали, промывали IPA (38 кг) и высушивали с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (46,7 кг, выход 69%) в виде белого твердого вещества.

### Получение промежуточного соединения 228

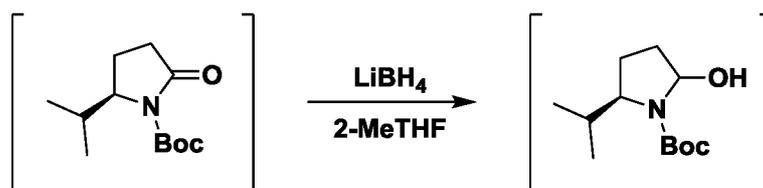
#### *трет*-бутил (*R*)-2-изопропил-5-оксопирролидин-1-карбоксилат



*трет*-бутил (*R*)-(1-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-метилбутан-2-ил)карбамат (**промежуточное соединение 227**) (46,7 кг) в толуоле (333 кг) нагревали с обратным холодильником и выдерживали в течение 4 ч. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды, фильтровали и промывали толуолом (20 кг). Объединенные фильтраты концентрировали досуха при пониженном давлении с получением целевого соединения (31,05 кг, выход 96%) в виде масла, которое использовали непосредственно без дополнительной очистки.

### Получение промежуточного соединения 229

#### *трет*-бутил (*5R*)-2-гидрокси-5-изопропилпирролидин-1-карбоксилат

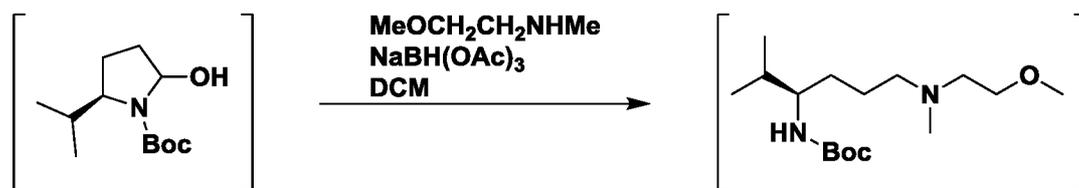


*трет*-бутил (*R*)-2-изопропил-5-оксопирролидин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 228**) (30,9 кг) в 2-МеТНФ (26,7 кг) охлаждали до температуры от -5 до 5 °С.

Раствор  $\text{LiBH}_4$  в 2-МеТНФ (1 М, 45,2 кг, 54,4 моль) добавляли в течение 3 ч, и смесь выдерживали в течение 4 ч. Холодный водный раствор 5%  $\text{NaHCO}_3$  (163 кг) добавляли при температуре от  $-5$  до  $5$  °С в течение 3 ч и выдерживали в течение дополнительных 2 ч. Смесь нагревали до температуры окружающей среды и выдерживали в течение еще 2 ч. Водный слой отделяли и органический слой промывали 10% водным раствором  $\text{NaCl}$  (170 кг) и водой (155 кг). Во время промывки водой образовывалась эмульсия, добавляли твердый  $\text{NaCl}$  (3,1 кг), для ее разделения. После удаления водного слоя органический слой концентрировали при пониженном давлении досуха с получением целевого соединения (28,5 кг, выход 91%) в виде масла, которое использовали непосредственно без дополнительной очистки.

### Получение промежуточного соединения 230

***трет*-бутил (*R*)-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)карбамат**



*трет*-бутил (5*R*)-2-гидрокси-5-изопропилпирролидин-1-карбоксилат (**промежуточное соединение 229**) (28,55 кг) в  $\text{DCM}$  (344 кг) при  $15$ – $25$  °С обрабатывали 2-метокси-*N*-метил-1-амином (12,3 кг, 138,0 моль) и полученную смесь выдерживали в течение 1 ч. Триацетоксиборгидрид натрия (40,12 кг) добавляли порциями в течение 5 ч, сохраняя температуру от  $15$  до  $25$  °С, и полученную смесь выдерживали в течение 48 ч. Реакционную смесь гасили добавлением 8% водного раствора  $\text{NaOH}$  (184 кг) в течение 2 ч, сохраняя температуру от  $15$  до  $25$  °С, и смесь выдерживали в течение еще 2 ч. Водный слой отделяли и органический слой промывали водой (169 кг). Впоследствии органический слой концентрировали при пониженном давлении досуха с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (33,26 кг, выход 88%) в виде масла, которое использовали непосредственно без дополнительной очистки.

### Получение промежуточного соединения 231

**(*R*)-*N*<sup>1</sup>-(2-метоксиэтил)-*N*<sup>1</sup>,5-диметилгексан-1,4-диамин, дигидрохлорид**



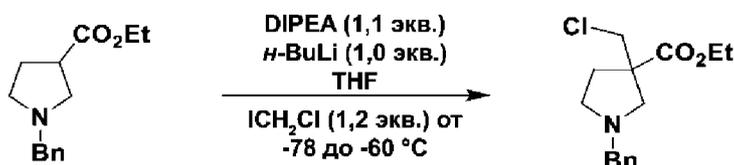
К 4 молярному раствору HCl в изопропанолe (84,80 кг) при температуре окружающей среды добавляли раствор *трет*-бутил-(*R*)-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)карбамата (**промежуточное соединение 230**) (32,38 кг) в изопропанолe (25,6 кг) в течение 3 ч и смесь выдерживали при температуре

5 окружающей среды в течение еще 19 ч. Впоследствии через 1 ч добавляли метил-*трет*-бутиловый эфир (95,25 кг) и смесь выдерживали в течение 2,5 ч. Полученную суспензию фильтровали и промывали МТВЕ (53 кг). Осадок на фильтре сушили с получением указанного в заголовке соединения (23,92 кг, выход 81 %) в виде белого твердого вещества.

10

### Получение промежуточного соединения 232

#### этил-1-бензил-3-(хлорметил)пирролидин-3-карбоксилат



К раствору DIPEA (952 г, 1,1 экв.) в THF (6 л), который охлаждали от -35 до -25 °C

15 добавляли *n*-BuLi (2,33 кг, 2,5 М в гексане, 1,0 экв.) при поддержании температуры ниже -25° C. Полученную смесь выдерживали при температуре от -35 до -25 °C в течение дополнительных 30 мин, впоследствии охлаждали до температуры от -78 до -60° C. Добавляли раствор этил-1-бензилпирролидин-3-карбоксилата (2 кг, 1,0 экв.) в THF (2 л) при температуре от -78 до -60°С и перемешивали в течение дополнительных

20 30 мин. Впоследствии добавляли хлорйодметан (1,81 кг, 1,2 экв.) при температуре от -78 до -60° C Реакционную смесь выдерживали при температуре от -60 до -40 °C в течение 2 ч. К реакционной смеси добавляли водный раствор лимонной кислоты (660 г в 6 л H<sub>2</sub>O) при температуре от 0 до 10 °C и полученную смесь выдерживали при 20–30 °C в течение еще 20 мин. После разделения слоев водный слой экстрагировали EtOAc

25 (6 л) и объединенные органические слои промывали солевым раствором (6 л), впоследствии нагревали до 50–60° C Щавелевую кислоту (2,22 кг) загружали при температуре 50–60 °C. Полученную смесь перемешивали при 50–60 °C в течение 3 ч, впоследствии охлаждали до 20–30° C и выдерживали в течение ночи. Полученное твердое вещество фильтровали, а осадок на фильтре промывали этилацетатом (2 л).

30 Влажный осадок добавляли к толуолу (4 л), H<sub>2</sub>O (8 л) и K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 экв.) и полученную смесь выдерживали при 20–30 °C в течение 20 мин. После разделения слоев водный

слой экстрагировали толуолом (2 л). Органические слои объединяли и промывали дважды водой (2 л). Органическую фазу концентрировали при пониженном давлении с получением 4,2 кг целевого соединения в виде толуольного раствора (46 масс. % по результатам анализа, выход 80%).

5

### Получение промежуточного соединения 233

#### 1-бензил-3-(хлорметил)пирролидин-3-карбальдегид



Реакции, проведенные в системе проточной химии: Раствор этил-1-бензил-3-

10 (хлорметил)пирролидин-3-карбоксилата (**промежуточное соединение 232**) (4,4 кг) в толуоле (26 л) перекачивали со скоростью 26,7 мл/мин и охлаждали до -60 °C. После охлаждения смесь смешивали с охлажденным раствором DIBAL-H (28,1 моль) в толуоле при -60 °C (28 л) со скоростью перекачивания 32,1 мл/мин. Смесь пропускали через реактор со спиральной трубкой с перфторалкокси (PFA) при -60 °C (общая

15 скорость потока 58,8 мл/мин с временем пребывания 5 секунд). Полученную смесь смешивали с охлажденным MeOH (-60 °C), который перекачивали при скорости 15,2 мл/мин. Этот смешанный раствор перекачивали в другой PFA-реактор со спиральной трубкой при -60 °C (общая скорость потока 74 мл/мин с временем пребывания 5

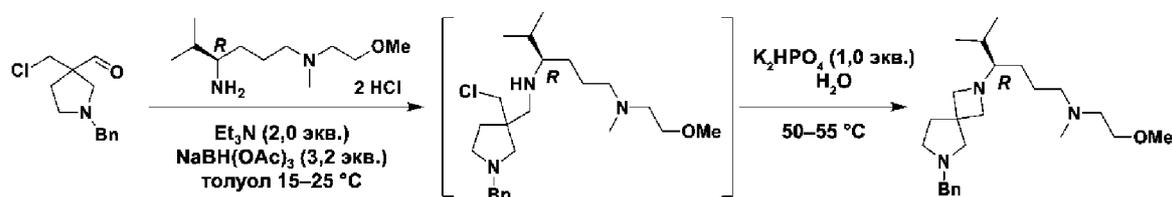
20 секунд). Полученную смесь собирали в приемник, который содержал 20% масс. водн. раствора сегнетовой соли (20 объемов). Слои разделяли и органическую фазу дважды промывали водой (2 × 44 л). Органическую фазу объединяли с другой партией массой 3,0 кг, полученной аналогичным образом и концентрировали при пониженном давлении с получением 20,8 кг толуольного раствора целевого соединения (25,5% масс. по анализу ВЭЖХ, выход по анализу 85%), которое использовали непосредственно без

25 дополнительной очистки.

**<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, хлороформ-d):** δ 9,62 (с, 1H), 7,39–7,20 (м, 5H), 3,83–3,57 (м, 4H), 2,96 (д, J = 10,2 Гц, 1H), 2,80–2,55 (м, 3H), 2,17 (ддд, J = 13,9, 7,9, 6,1 Гц, 1H), 1,83 (ддд, J = 13,4, 7,8, 5,5 Гц, 1H).

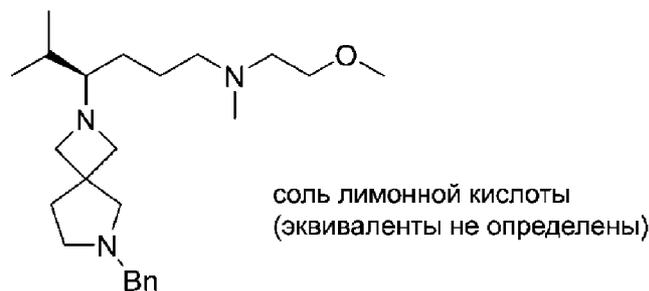
### Получение промежуточного соединения 234

**(R)-4-(6-бензил-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметилгексан-1-амин**



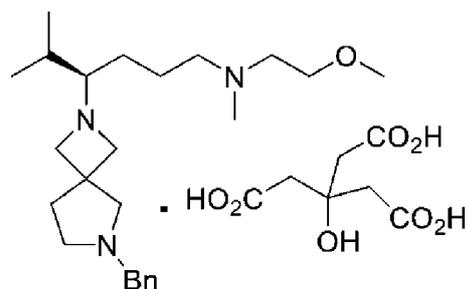
- 5 К раствору 1-бензил-3-(хлорметил)пирролидин-3-карбальдегида (**промежуточное соединение 233**) в толуоле (3,0 кг, 10% масс.), разведенному толуолом (30 л), и (R)-N<sup>1</sup>-(2-метоксиэтил)-N<sup>1</sup>,5-диметилгексан-1,4-диамина дигидрохлорида (**промежуточное соединение 231**) (3,47 кг) добавляли триэтиламин (2,55 кг, 25,2 моль) при 20–30 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20–30 °С. Впоследствии добавляли
- 10 триацетоксиборгидрид натрия (9,0 кг) при 20–30 °С и смесь выдерживали в течение 12 ч. Реакционную смесь охлаждали до 5–15 °С и добавляли 25% (масс.) водн. раствор NaOH (25 л, ~16,75 экв.), поддерживая температуру ниже 35 °С. Полученную смесь выдерживали при 20–30 °С в течение 25 мин и слои разделяли. Органический слой промывали 15% (масс.) водным раствором NaCl (10 л), слои снова разделяли и в
- 15 органическую фазу добавляли воду (18 л). pH смеси довели до 6~7 при помощи 4М водн. HCl, сохраняя внутреннюю температуру ниже 35 °С. Впоследствии органическую фазу отбрасывали и водную фазу отделяли и подщелачивали до pH 8~9 с помощью K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- Полученную смесь нагревали до 50–55 °С и выдерживали в течение 3 ч. Реакционную
- 20 смесь впоследствии охлаждали до температуры окружающей среды и объединяли с другими двумя партиями (2,4 кг и 3,0 кг). Объединенные потоки промывали метило-*трет*-бутиловым эфиром три раза (3 x 40 л). К полученному водному слою добавляли дополнительный метил-*трет*-бутиловый эфир (83 л) и водную фазу подщелачивали до pH 9~10 с использованием 8 % (масс.) водн. раствора NaOH, поддерживая температуру
- 25 от 15 до 35 °С. Водный слой отделяли и органический слой промывали трижды водой (3 x 30 л). Впоследствии органический слой концентрировали при пониженном давлении до приблизительно 3 объемов, а впоследствии продували метанолом три раза (3 x 30 л) и концентрировали досуха с получением целевого промежуточного
- 30 соединения (12,4 кг, выход выделенного соединения 90%) в виде светло-желтого масла, которое использовали непосредственно без дополнительной очистки.

**Получение промежуточного соединения 234a (соль лимонной кислоты промежуточного соединения 234)**



В круглодонную колбу добавляли EtOH (80 мл) и промежуточное соединение 234 (20 г). Затем добавляли 0,5 М раствор лимонной кислоты в EtOH (100 мл; 1 эквивалент) в смесь в круглодонной колбе при комнатной температуре. Затем смесь выпаривали до сухого остатка (Rotavap, 40 °С). К остатку добавляли ацетонитрил (200 мл) и смесь выпаривали досуха (Rotavap, 40 °С). К остатку добавляли ацетонитрил (100 мл) и перемешивали в течение ночи на магнитной пластине с подогревом при комнатной температуре. Наконец, промежуточное соединение 234a отфильтровывали и высушивали при комнатной температуре.

**Получение кристаллической формы соли лимонной кислоты промежуточного соединения 234 (промежуточное соединение 234b)**



15 соотношение кристаллической формы пром. соединения / лимонной кислоты 3/2

Промежуточное соединение 234a (3,72 г) добавляли к ацетонитрилу (20 мл) при комнатной температуре и смесь перемешивали. Смесь нагревали до 60 °С до тех пор, пока реакционная смесь не становилась гомогенной (около 10 минут). Затем смесь охлаждали до 50 °С со скоростью 0,5 °С/мин. Затем добавляли затравку (19 мг промежуточного соединения 234a; 0,5% масс.) и смесь выдерживали при перемешивании в течение 3 часов и 30 минут. Затем смесь нелинейно охлаждали до 20 °С в течение 8 часов с экспонентой 2,3. Полученную смесь перемешивали в течение

ночи и продукт отфильтровывали и высушивали (в течение ночи при комнатной температуре в вытяжном шкафу).

После выделения получали промежуточное соединение 234b (2,75 г; выход 73,9%) в виде кристаллической формы соли лимонной кислоты промежуточного соединения 234. Полученное соотношение промежуточного соединения / лимонной кислоты составляет 3/2 (ЯМР).

Описанное выше нелинейное охлаждение осуществляли в соответствии с формулой ниже:

Новое линейное изменение начинается каждые 30 секунд в течение заданной продолжительности охлаждения. Изменение рассчитывают по следующему уравнению:

$$T_{\text{заданное}} = T_{\text{начальное значение}} - \left[ (T_{\text{начальное значение}} - T_{\text{конечное значение}}) * \left( \frac{t_{\text{действия}} + 30 \text{ с}}{\text{Продолжительность}} \right)^n \right]$$

$T_{\text{заданное}}$ : заданное значение для каждого нового линейного изменения

$T_{\text{начальное значение}}$ : измеренная температура смеси в начале траектории охлаждения

$T_{\text{конечное значение}}$ : определенная конечная величина траектории охлаждения

$t_{\text{действия}}$ : фактическое время от начала охлаждения

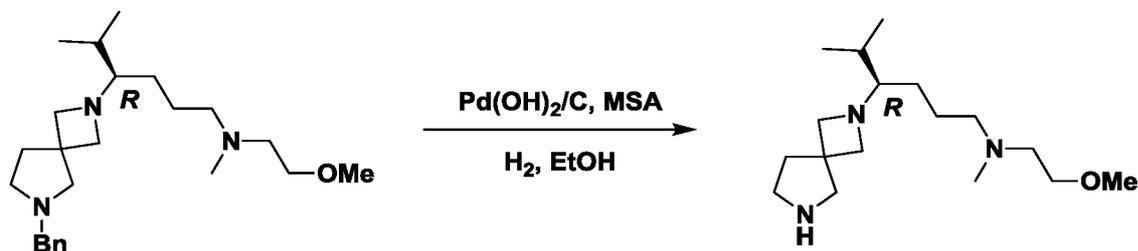
Продолжительность: определенная длительность охлаждения

n: экспонента

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  ч/млн 0,91 (3 H, д,  $J = 6,88$  Гц) 0,98 (3 H, д,  $J = 6,88$  Гц) 1,46–1,57 (2 H, м) 1,67–1,87 (2 H, м) 1,94–2,03 (1 H, м) 2,20–2,29 (2 H, м) 2,62–2,69 (2 H, м) 2,72–2,77 (4 H, м) 2,77–2,82 (2 H, м) 2,90 (2 H, т,  $J = 7,32$  Гц) 2,95–3,02 (2 H, м) 3,07–3,16 (2 H, м) 3,16–3,22 (2 H, м) 3,37 (3 H, с) 3,68–3,72 (2 H, м) 3,83–3,89 (2 H, м) 3,90–3,92 (2 H, м) 3,94–4,06 (2 H, м) 7,32–7,43 (5 H, м).

### Получение промежуточного соединения 224

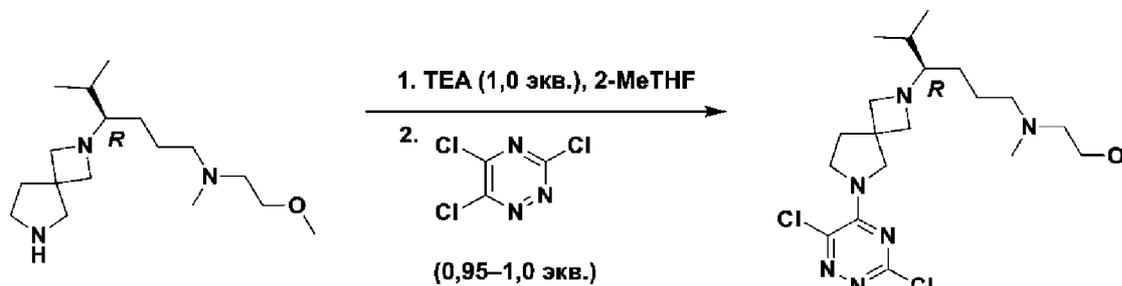
**(R)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметил-4-(2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)гексан-1-амин**



- 5 К гидроксиду палладия на углеродном носителе (1,2 кг) в EtOH (1,47 кг), охлажденному до -5–5 °С, добавляли метансульфоновую кислоту (MSA) (11 кг), (R)-4-(6-бензил-2,6-дiazаспиро[3.4] октан-2-ил)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметилгексан-1-амин (**промежуточное соединение 234**) (10 кг) и EtOH (250 л). Смесь нагревали до 35–45 °С и перемешивали в атмосфере водорода (от 0,27 до 0,40 МПа) в течение 16–20 часов.
- 10 Смесь фильтровали через диатомит (20 кг) и слой промывали EtOH (24 л). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении (< 40 °С) до 2~3 объемов и впоследствии дважды продували 2-МеТНФ (73 кг и 47 кг) с получением 2~3 объемов раствора. После разбавления 2-МеТНФ (65 кг) добавляли 10% водн. сульфат натрия (30 кг) и смесь
- 15 охлаждали до 0–10 °С с последующим добавлением 16% водн. NaOH (50 кг) для доведения рН до 13~14. Температуру доводили до 15–25 °С и перемешивали в течение 30–60 мин. Водный слой отделяли и дважды экстрагировали 2-МеТНФ (47 кг x 2). Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении (< 40 °С) до 3~4 объемов и добавляли 2-МеТНФ (950 г). После концентрирования при
- 20 пониженном давлении (< 40 °С) до 3~4 объемов полученный раствор разводили 2-МеТНФ (30 кг), высушивали, пропуская через 4А молекулярные сита (25 кг) и промывали 2-МеТНФ (30 кг). Конечный раствор концентрировали с получением целевого соединения (6,7 кг) в виде масла с чистотой 90,1% по анализу в 79% скорректированном выходе.

### Получение промежуточного соединения 225

**(R)-4-(6-(3,6-дихлор-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметилгексан-1-амин**



- 5 К (R)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметил-4-(2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)гексан-1-амину (промежуточное соединение 224) (100 г) добавляли 2-МеТНФ (430 г) и ТЕА (68 г) и смесь охлаждали до температуры от -50 до -40 °С. 3,5,6-трихлор-1,2,4-триазин (62 г) добавляли в 2-МеТНФ (172 г) и смесь перемешивали в течение 1–3 ч. Полученную смесь нагревали до температуры от -20 до -10 °С и добавляли водный раствор 7%
- 10  $\text{NaHCO}_3$ , смесь нагревали до 20–30 °С и перемешивали в течение 30–60 мин. Водный слой удаляли и органический слой промывали 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (500 г). Органический слой сушили, пропуская через молекулярные сита 4Å (220 г) и промывали 2-МеТНФ (180 г). Указанное в заголовке промежуточное соединение получали с аналитическим выходом 90% в виде раствора 14,8% масс. в 2-МеТНФ.

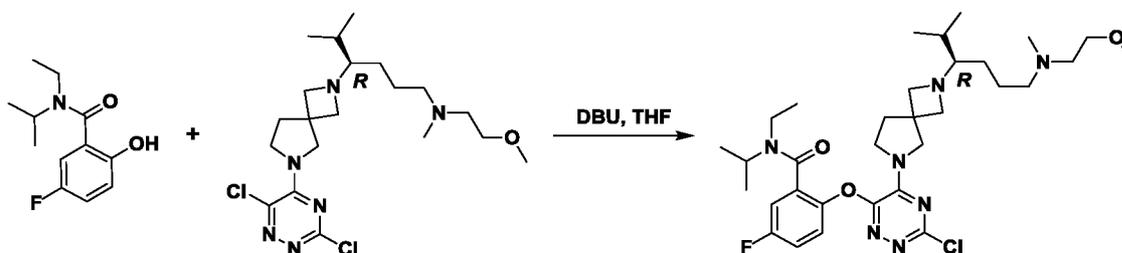
15

### Соединение 393

**(R)-2-((3-хлор-5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)-N-этил-5-фтор-N-изопропилбензамид**

20

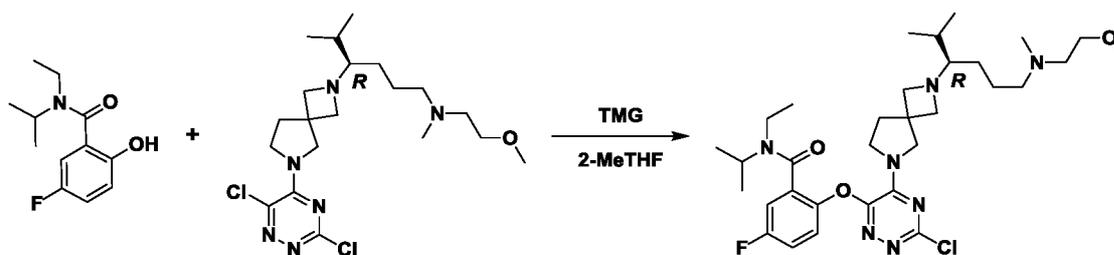
Способ А синтеза для промежуточного соединения 393



- Смесь N-этил-5-фтор-2-гидрокси-N-изопропилбензамида (промежуточное соединение 28) (1,10 г, 4,88 ммоль), (R)-4-(6-(3,6-дихлор-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-2-ил)-N-(2-метоксиэтил)-N,5-диметилгексан-1-амин
- 25

(**промежуточное соединение 225**) (1,70 г, 3,82 ммоль) и DBU (750 мг, 4,93 ммоль) в безводном THF (15 мл) перемешивали при 40 °С в течение 8 ч. После охлаждения до комн. темп. смесь концентрировали при пониженном давлении, полученный остаток разводили DCM (60 мл) и промывали H<sub>2</sub>O (20 мл × 3). Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали КФХ (MeOH/DCM = от 0% до 10%) с получением желтого масла (1,40 г), которое дополнительно разделяли с помощью СФХ на DAICEL CHIRALPAK AD (колонка: 250×50 мм, 10 мкм; подвижная фаза: А: сверхкритический CO<sub>2</sub>, В: EtOH (0,1% аммиака), А : В = 50 : 50 при 70 мл/мин; темп. колонки: 38 °С; давление в насадке: 100Bar; темп. в насадке: 60 °С; темп. испарителя: 20 °С; темп. триммера: 25 °С; длина волны: 220 нм) с получением указанного в заголовке соединения (1,0 г).

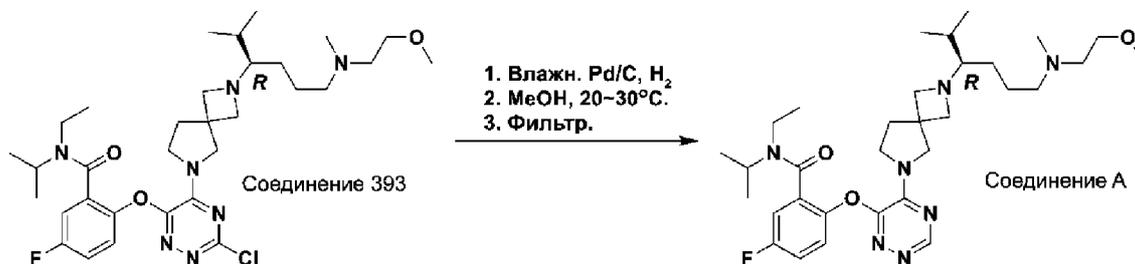
Способ А синтеза для промежуточного соединения 393



К раствору (*R*)-4-(6-(3,6-дихлор-1,2,4-триазин-5-ил)-2,6-дiazоспиро[3.4]октан-2-ил)-*N*-(2-метоксиэтил)-*N*,5-диметилгексан-1-амина (**промежуточное соединение 225**) 2-МеТНФ (676 г из 14,8% масс. раствора в 2-МеТНФ, 100 г откорректированного **промежуточного соединения 225**) и *N*-этил-5-фтор-2-гидрокси-*N*-изопропилбензамида (**промежуточное соединение 28**) (50,6 г) в 2-МеТНФ (40 г) при 20–30 °С добавляли тетраметилгуанидин (31 г) и смесь перемешивали в течение 40–48 ч. Добавляли водный раствор 7% NaHCO<sub>3</sub> (500 г), и смесь перемешивали в течение 30–60 мин. Водный слой удаляли и органический слой дважды промывали 4% водным раствором NaOH (2 × 500 г) и один раз 10% водным раствором Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (500 г). Органический слой концентрировали при пониженном давлении (< 40 °С) до 2,2–3,0 об. и три раза продували MeOH (1 × 790 г и 2 × 395 г) до тех пор, пока содержание как 2-МеТНФ, так и воды не составило ≤ 1,0%, с получением целевого соединения с 86% аналитическим выходом 60,1% масс. в виде раствора в метаноле.

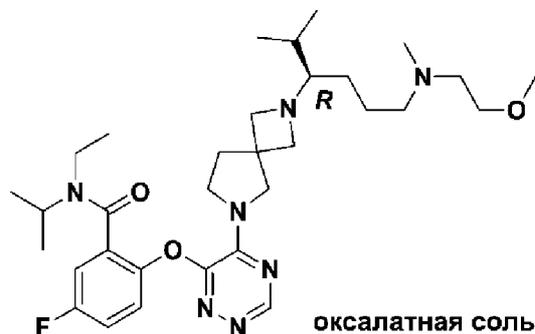
## Соединение А

**(R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид**



Метаноловый раствор (R)-2-((3-хлор-5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси-N-этил-5-фтор-N-изопропилбензамида (**соединение 393**) (163,93 г 60,1% масс. раствора в MeOH, 100 г в пересчете на **соединение 393**), палладий на углеродном носителе (10 г) и MeOH (316 г) перемешивали при 20–30 °С в атмосфере водорода (0,20–0,30 МПа) в течение 18 ч. Смесь фильтровали через диатомит (75 г) и осадок промывали MeOH (158 г). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении ( $\leq 40$  °С) до ~3 объемов, впоследствии продували изопропилацетатом (IPAc, 870 г), концентрируя до ~3 10 объемов. Впоследствии смесь разводили IPAc (696 г) и добавляли водный раствор 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (500 г). Смесь перемешивали в течение 30–60 мин. Водный слой удаляли. Органический слой промывали водой (500 г), впоследствии концентрировали при пониженном давлении < 45 °С до ~3 объемов. Указанное в заголовке промежуточное 15 соединение получали приблизительно с 90% аналитическим выходом в виде 48,1% масс. раствора в IPAc. 20

**Пример 4. Синтез (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид оксалата (соединение А3)**



**5 Соединение А3**

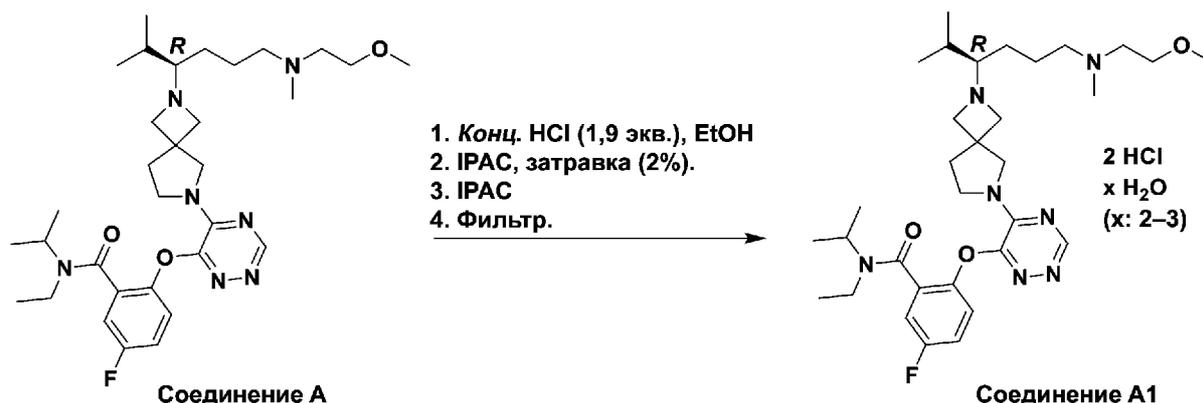
К раствору (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (соединение А) (270 мг, 0,450 ммоль) в 20 мл АСN (20 мл) добавляли оксаловую кислоту (81,0 мг, 0,900 ммоль). После добавления реакционную смесь перемешивали при комн. темп. в течение 1 ч. Впоследствии реакционную смесь концентрировали, остаток повторно растворяли в АСN и деионизированной воде и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (350 мг) в виде белого твердого вещества.

**<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*<sub>4</sub>):** δ = 8,48 (с, 1H), 7,52–7,11 (м, 3H), 4,54–3,64 (м, 12H), 3,40–3,34 (м, 5H), 3,23–3,13 (м, 2H), 2,90 (с, 3H), 2,54–2,27 (м, 2H), 2,19–2,03 (м, 1H), 1,97–1,77 (м, 2H), 1,75–1,50 (м, 2H), 1,35–0,65 (м, 17H).

**<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 8,51 (с, 1H), 7,51–7,29 (м, 3H), 4,29–3,34 (м, 12H), 3,23–2,84 (м, 7H), 2,70 (с, 3H), 2,35–2,09 (м, 2H), 2,05–1,85 (м, 1H), 1,81–1,58 (м, 2H), 1,56–1,33 (м, 2H), 1,18–0,60 (м, 17H).

**ЖХМС (ИЭР) (способ 2):** R<sub>t</sub> = 1,969 мин, полученное значение m/z: 600,4 [M+H]<sup>+</sup>.

### Пример 5. Синтез промежуточного соединения А1



К раствору соединения А (207,90 г 48% масс. раствора в IPAC, 100 г активного соединения А) в IPAC (360 г) добавляли EtOH (63 г) при 20–25 °С. Впоследствии раствор обрабатывали конц. HCl (32,9 г) в EtOH (49,5 г) в течение ~15 мин. В смесь добавляли затравку кристаллического соединения А1 (2 г, 2% затравочного вещества), впоследствии выдерживали в течение 18 ч. IPAC (870 г) медленно добавляли в течение 4 ч при температуре от 20 до 25 °С и суспензию перемешивали еще 18 ч. После охлаждения до ~5 °С продукт фильтровали, промывали IPAC (522 г) и сушили в вакууме при 20–30 °С с получением слабокристаллического соединения А1 в виде белого твердого вещества (выход 91,0%, 115,4 г). (Примечание. Небольшое количество затравочного материала, используемого в реакционной смеси, получали посредством аналогичного протокола реакции в малом масштабе.

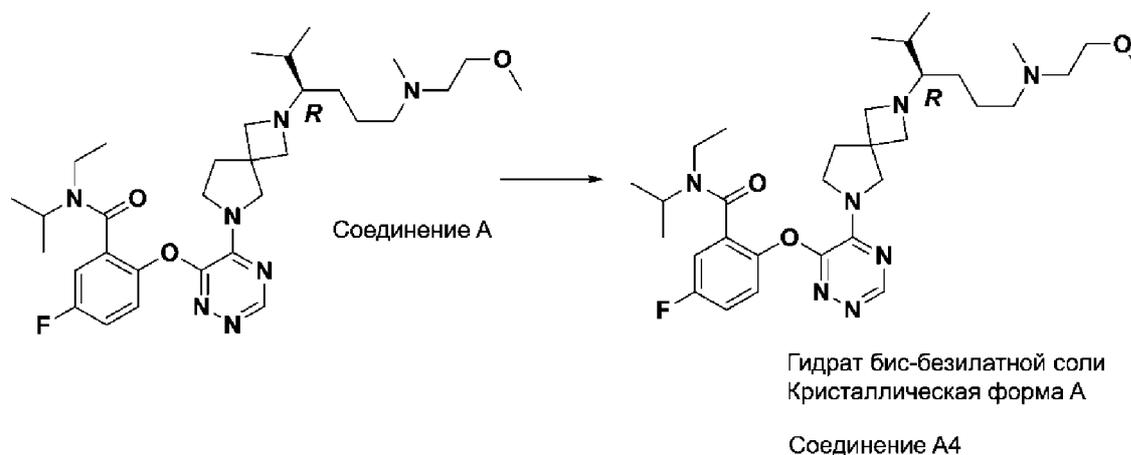
Перекристаллизация. Раствор слабокристаллического соединения А1 (100 г), EtOH (166 г), очищенную воду (21,5 г) и IPAC (178 г) перемешивали при 20–30 °С в течение 0,5–2 ч для получения прозрачного раствора. Добавляли по каплям дополнительное количество IPAC (522 г) в течение 1~2 ч, а впоследствии к смеси добавляли кристаллическое соединение А1 в качестве затравки кристаллизации (2 г, 2% затравочного вещества). Впоследствии смесь выдерживали в течение 18~20 ч, медленно добавляли IPAC (348 г) в течение 12 ч при температуре от 20 до 30 °С и суспензию перемешивали еще 55~60 ч. Продукт фильтровали, промывали IPAC (158 г) и сушили в вакууме при 20~30 °С с получением соединения А1 в виде белого твердого вещества (выход 85%, 85,0 г, без примесей).

<sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 МГц): δ = 11,60 (1H, уш.с), 10,8 (1H, уш.с), 8,52 (1H, с), 7,36 (3H, м), 3,97–4,20 (7H, м), 3,64–3,71 (4H, м), 3,47 (7H, м), 3,25 (2H, м), 3,05 (3H, м), 2,73

(3H, c), 2,10–2,45 (1H, m), 1,99 (1H, m), 1,78 (2H, m), 1,55 (2H, m), 0,83–1,12 (12H, m), 0,70 (2H, m).

**ЖХМС (способ 7):**  $R_t = 0,669$  мин, полученное значение  $m/z$ : 600,5  $[M+H]^+$ .

- 5 **Пример 6. Синтез кристаллической формы А гидрата (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид бис-безилатной соли (соединение А4) (эквивалентная вода не определена)**



- 10 Добавляли 43,06 г бензолсульфоновой кислоты (2 эквивалента относительно свободного основания соединения А) к 840 мл смеси ацетона/воды 95/5 об./об. и растворяли. Добавляли 192,8 г раствора соединения А (содержащего 80 г АФИ) в ИРАС. Материал растворяли, получая прозрачный раствор. Добавляли еще 80 мл ИРАС и доводили температуру до 25 °С. Добавляли 2% затравочного материала и
- 15 перемешивали смесь в течение часа при 25 °С. Впоследствии в течение 8 часов добавляли 28,8 об. (2312 мл) ИРАС. После этого суспензию перемешивали в течение 18 ч при 25 °С. Суспензию фильтровали и промывали 320 мл смеси ацетон/вода/ИРАС 23,75/1,75/75 об./об./об. Получали 122,91 г кристаллической формы А бис-безилатгидрата (эквивалентная вода не определена).

- 20 Специалисту в данной области будет понятно, что небольшое количество исходного затравочного материала, используемого в реакционной смеси, может быть получено посредством аналогичного протокола реакции в малом масштабе без добавления затравки и ожидания спонтанного зародышеобразования.

- 25 Исходный затравочный материал безилатной соли также получали в ходе экспериментов по скринингу солей. В этих экспериментах 100 мг свободного

основания взвешивали в 2 мл флаконах, а впоследствии добавляли 200 мкл этилацетата или ацетона для растворения свободного основания. К образцам добавляли 1 экв. противоионов (бензолсульфоновая кислота) и образцы перемешивали при 25 °С в течение 3 дней. Полученную суспензию центрифугировали и давали исходный затравочный материал.

Соответствующее количество кристаллической формы А гидрата (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид бис-безилатной соли растворяли в дейтерированном DMSO и регистрировали спектр 1D <sup>1</sup>H ЯМР.

На спектрометре ЯМР Bruker AVANCE NEO-600 МГц, оснащенный зондом высокого разрешения Bruker 5 мм PA BBO 600S3 BB-H-D-05 Z-GRD и работающем под управлением программного обеспечения TOPSPIN 4.0, был проведен одномерный протонный эксперимент при температуре 300 К на образце в дейтерированном DMSO.

<sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, dMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ч/млн. 0,69 (уш. с, 2 H) 0,82–0,98 (м, 9 H) 1,07 (уш. с, 4 H) 1,31–1,46 (м, 1 H) 1,51 (уш. д, *J* = 2,91 Гц, 1H) 1,69 (уш. д, *J* = 3,45 Гц, 2 H) 1,98 (уш. с, 1 H) 2,06–2,45 (м, 2 H) 2,77 (уш. с, 3 H) 2,87–3,19 (м, 3 H) 3,24 (уш. с, 1 H) 3,31 (с, 6 H) 3,64 (уш. с, 4 H) 3,71–4,59 (м, 7 H) 7,24–7,54 (м, 9 H) 7,61 (уш. д, *J* = 7,27 Гц, 4H) 8,45–8,60 (м, 1H) 9,24 (уш. с, 1H) 9,44–9,82 (м, 1H).

**Пример 7. Альтернативный синтез кристаллической формы А гидрата (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид бис-безилатной соли (соединение А4) (эквивалентная вода не определена)**

В колбу загружали смесь изопропанола/воды 95/5 (24 мл) и нагревали до 40 °С.

Добавляли бензолсульфоновую кислоту (4,31 г; 98%). Затем добавляли 19,3 г раствора соединения А (содержащего 8 г соединения А) в IPAc. Добавляли еще 16 мл IPAc.

Добавляли 2% затравочного материала и перемешивали смесь в течение 1 часа при 40

°С. Впоследствии по каплям добавляли IPAc (115,2 мл) в течение 8 часов. Далее смесь охлаждали до 0 °С в течение 15 часов. Суспензию фильтровали и влажный осадок промывали (IPA/H<sub>2</sub>O 95/5)/IPAc 1/6 (32 мл). Влажный осадок сушили при 25 °С в течение 16 часов с получением 11,44 г кристаллической формы А бис-безилатгидрата (эквивалентная вода не определена).

В примерах соединения А4 представляет собой соединение по п. 1. Другие соединения в примерах приводятся в качестве иллюстрации. Некоторые промежуточные соединения (например, промежуточное соединение 234b) являются промежуточными соединениями по формуле изобретения.

#### **АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ВЫШЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ**

Аналитическая информация в соединениях выше была получена с использованием аналитических методов, описанных ниже.

#### **Способы ЯМР**

Некоторые эксперименты ЯМР проводили на спектрометре Bruker Avance III 400 при температуре окружающей среды (298,6 К) с использованием внутренней блокировки дейтерия, оснащенном 5 мм зондирующей головкой BBO 400MHz S1 с z-градиентами, работающем на частотах 400 МГц для протона и 100 МГц для углерода. Химические сдвиги ( $\delta$ ) представлены в частях на миллион (ч/млн). Значения J выражены в Гц.

Некоторые эксперименты ЯМР проводили на спектрометре Varian 400-MR при температуре окружающей среды (298,6 К) с использованием внутренней блокировки дейтерия, оснащенном зондирующей головкой Varian 400 4NUC PFG с z-градиентами, работающем на частотах 400 МГц для протона и 100 МГц для углерода. Химические сдвиги ( $\delta$ ) представлены в частях на миллион (ч/млн). Значения J выражены в Гц.

Некоторые эксперименты ЯМР проводили на спектрометре Varian 400-VNMRS при температуре окружающей среды (298,6 К) с использованием внутренней блокировки дейтерия, оснащенном зондирующей головкой Varian 400 ASW PFG с z-градиентами, работающем на частотах 400 МГц для протона и 100 МГц для углерода. Химические сдвиги ( $\delta$ ) представлены в частях на миллион (ч/млн). Значения J выражены в Гц.

Некоторые эксперименты ЯМР проводили на спектрометре Bruker AVANCE III HD 300 при температуре окружающей среды (298,6 К) с использованием внутренней блокировки дейтерия, оснащенном 5 мм зондирующей головкой PA BBO 300S1 BBF-H-D-05 Z с z-градиентами, работающем на частотах 300 МГц для протона и 75 МГц для углерода. Химические сдвиги ( $\delta$ ) представлены в частях на миллион (ч/млн). Значения J выражены в Гц.

**ЖХМС (жидкостная хроматография / масс-спектрометрия)**

Общая процедура

Измерение посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили с использованием насоса ЖХ, диодной матрицы (DAD) или

5 ультрафиолетового детектора и колонки, как указано в соответствующих методах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. таблицу 2 ниже).

Поток из колонки довели до масс-спектрометра (МС), который был сконструирован с источником ионного давления. Специалисту в данной области известны параметры настройки (например, диапазон сканирования, время ожидания...) для получения  
10 ионов, позволяющих идентифицировать номинальную моноизотопную молекулярную массу (MW) соединения. Сбор данных осуществляли с использованием соответствующего программного обеспечения.

Соединения описаны их экспериментальным временем удерживания ( $R_t$ ) и ионами.

Если в таблице данных не указано иное, указанный молекулярный ион соответствует  
15  $[M+H]^+$  (протонированная молекула) и/или  $[M-H]^-$  (депротонированная молекула). В случае, если соединение не было непосредственно ионизируемым, указан тип аддукта (например,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+HCOO]^-$ , и т. д.). Для молекул с несколькими изотопами (Br, Cl...) указанное значение представляет собой значение, полученное для самой низкой изотопной массы. Все результаты были получены с экспериментальными  
20 неопределенностями, которые обычно связаны с используемым методом.

Здесь и далее в настоящем документе «SQD» означает «одинокый квадрупольный детектор», «комн. темп.» — комнатная температура, «ВЕН» — мостиковый гибрид этилсилоксана / диоксида кремния, «HSS» — диоксид кремния повышенной прочности,  
25 «DAD» — диодно-матричный детектор.

Таблица 2. Коды метода ЖХМС (поток, экспрессируемый в мл/мин; температура колонки (Т) в °С; время прогона в минутах).

Код метода	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток — Т колонки	Время прогона
1	Agilent	Waters XBridge C18 (2,0 x 50 мм, 5 мкМ)	подвижная фаза А: H <sub>2</sub> O с 0,04% TFA; подвижная фаза В: ACN с 0,02% TFA	100% А выдерживали в течение 1 мин, применяли градиент А от 100% А до 40% А за 4 мин и от 40% А до 15% А за 2,5 мин. И впоследствии возвращали к 100% А за 2 мин и выдерживали в течение 0,5 мин. Время восстановления — 0,5 мин.	0,8 — 50	10

Код метода	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток — Т колонки	Время прогона																					
2	Agilent	Waters XBridge C18 (2,0 x 50 мм, 5 мкм)	подвижная фаза А: H <sub>2</sub> O с 0,04% TFA; подвижная фаза В: ACN с 0,02% TFA	Сначала 90% А выдерживали в течение 0,8 мин. Впоследствии применяли градиент 20% А и 80% В за 3,7 мин. и выдерживали в течение 3 мин. И впоследствии возвращали к 90% А за 2 мин и выдерживали в течение 0,5 мин. Время восстановления — 0,5 мин.	0,8 — 50	10																					
7	Agilent LC 1260 с MS6120	XBridge C18, 4,6 x 150 мм, 3,5 мкм	Подвижная фаза А 0,05% TFA в H <sub>2</sub> O Подвижная фаза В 0,05% TFA в ACN	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Время (мин)</th> <th>А%</th> <th>В%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Начальное</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>11,0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>13,0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15,0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>16,0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20,0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Время (мин)	А%	В%	Начальное	95	5	11,0	65	35	13,0	5	95	15,0	5	95	16,0	95	5	20,0	95	5	1,5 — 45	20
Время (мин)	А%	В%																									
Начальное	95	5																									
11,0	65	35																									
13,0	5	95																									
15,0	5	95																									
16,0	95	5																									
20,0	95	5																									

### Аналитическая СФХ

Общая процедура для способов СФХ

Измерения СФХ проводили с использованием аналитической системы сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ), состоящей из бинарного насоса для подачи углекислого газа (CO<sub>2</sub>) и модификатора, автодозатора, колоночного термостата, детектора с диодной матрицей, оснащенного проточной ячейкой высокого давления до 400 бар. Данные аналитической СФХ приведены ниже в таблице 3. При установке с масс-спектрометром (МС) поток из колонки довели до (МС).  
 5 Специалисту в данной области известны параметры настройки (например, диапазон сканирования, время ожидания...) для получения ионов, позволяющих идентифицировать номинальную моноизотопную молекулярную массу (MW) соединения. Сбор данных осуществляли с использованием соответствующего программного обеспечения.  
 10

15

Таблица 3. Методы аналитической СФХ (поток, выраженный в мл/мин; температура колонки (Т) в °С; Время прогона в минутах, противодавление (BPR) в барах или фунт-силе на квадратный дюйм (psi). «ACN» означает ацетонитрил; «MeOH» означает метанол; «EtOH» означает этанол; «DEA» означает диэтиламин. Все другие сокращения, используемые ниже в таблице, определены ранее)  
 20

Код метода	колонка	подвижная фаза	градиент	Поток	Время прогона
				Т колонки	BPR
11	Waters UPCC с PDA (Chiralpak IG-3 100 × 4,6 мм I.D., 3 мкм)	А: сверхкритический CO <sub>2</sub> , В: EtOH (0,05% DEA)	от 5% до 40% В за 4 мин и поддержание 40% в течение 2,5 мин, после чего 5% В в течение 1,5 мин	2,8	8
				35	1500 фунтов/кв. дюйм

### Кристаллическая форма промежуточного соединения 234b

Кристаллическая форма промежуточного соединения 234b может быть охарактеризована по порошковой рентгеновской дифрактограмме.

5 Анализ рентгеновской порошковой дифрактометрией (XRPD) проводился на дифрактометре PANalytical Aeris. Прибор оснащен рентгеновской трубкой Cu-K $\alpha$  с настраиваемой оптикой iCore и dCore для падающего и отраженного пучка соответственно. Соединение загружали в полость 16-мм держателя пробы с использованием методики обратной загрузки.

10 Пробы анализировали на XRPD с использованием следующего метода:

Трубка: Cu: К-альфа ( $\lambda = 1,541874 \text{ \AA}$ )

Генератор: напряжение: 45 кВ; ток: 15 мА

Геометрия: Брегг — Brentano

Режим сканирования: непрерывное сканирование

15 Диапазон сканирования: 4–50 град.

Размер шага: 0,0217 град.

Время подсчета: 58 с

Время оборота вращателя: 1 сек

20 Путь падающего луча (iCore)

Щель расходимости: 1/4°

Щель Соллера: 0,04 рад

Маска 1: 9 мм

25 Путь отраженного луча (dCore)

Противорассеивательная щель: 9 мм

Облучаемая длина: 10 мм

Щель Соллера: 0,04 рад

Детектор: PIXcel3D- Medipix3 1x1

5 Специалисту в данной области будет понятно, что дифракционные картины и  
положения пиков  
обычно по существу не зависят от применяемого дифрактометра и от того,  
использовался ли конкретный способ калибровки. Как правило, положения пиков могут  
отличаться на величину около  $\pm 0,2^\circ$  два тета или менее. Интенсивности (и  
относительные интенсивности) каждого конкретного дифракционного пика могут  
10 также варьировать в зависимости от различных факторов, включая, без ограничений,  
размер частиц, ориентацию, чистоту пробы и т. д.

Рентгеновская порошковая дифрактограмма содержит пики при 5,82, 10,09 и  
18,42 градуса два тета  $\pm 0,2$  градуса два тета.

15 Порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит пики при 5,82, 8,52, 9,20,  
10,09, 11,43, 13,61, 14,94, 15,89, 17,03 и 18,42 градуса два тета  $\pm 0,2$  градуса два тета.

Промежуточное соединение 234b может дополнительно характеризоваться  
порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей четыре, пять, шесть, семь,  
восемь, девять или более пиков, выбранных из этих пиков.

20 Промежуточное соединение 234b также может характеризоваться порошковой  
рентгеновской дифрактограммой, по существу такой, как показано на Фиг. 4.

### **Кристаллическая форма А**

25 Кристаллическая форма А гидрата (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-  
((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-  
1,2,4-триазин-6-ил)окси) бензамид бис-безилатной соли может быть охарактеризована  
порошковой рентгенограммой.

30 Порошковую рентгенографию (XRPD) выполняли на дифрактометре PANalytical  
Empyrean. Прибор оснащен рентгеновской трубкой Cu-K $\alpha$  с настраиваемой оптикой  
iCore и dCore для падающего и отраженного пучка соответственно. Соединение  
загружали в полость 16-мм держателя пробы с использованием методики обратной  
загрузки.

Пробы анализировали на XRPD с использованием следующего метода:

Трубка: Cu: K-альфа ( $\lambda = 1,541874 \text{ \AA}$ )

Генератор: напряжение: 45 кВ; ток: 40 мА

Геометрия: Брегг — Brentano

Режим сканирования: непрерывное сканирование

Диапазон сканирования: 3–35 град.

Размер шага: 0,0131 град.

5 Время подсчета: 30 с

Время оборота вращателя: 1 сек

Путь падающего луча (iCore)

Программ. щель расходимости: автоматич.

10 Облучаемая длина: 10 мм

Щель Соллера: 0,03 рад

Маска 1: 14 мм

Маска 2: 6 мм

Ширина: 7,7 мм

15

Путь отраженного луча (dCore)

Противорассеивательная щель: автоматич.

Облучаемая длина: 10 мм

Щель Соллера: 0,04 рад

20 Детектор: PIXcel3D- Medipix3 1x1

Специалисту в данной области будет понятно, что дифракционные картины и положения пиков

обычно по существу не зависят от применяемого дифрактометра и от того,

25 использовался ли конкретный способ калибровки. Как правило, положения пиков могут отличаться на величину около  $\pm 0,2^\circ$  два тета или менее. Интенсивности (и относительные интенсивности) каждого конкретного дифракционного пика могут также варьировать в зависимости от различных факторов, включая, без ограничений, размер частиц, ориентацию, чистоту пробы и т. д.

30 Рентгеновская порошковая дифрактограмма содержать пики при 5,4, 7,2, 11,1, 11,9 и 21,7 градуса два тета  $\pm 0,2$  градуса два тета. Рентгеновская порошковая дифрактограмма может дополнительно содержать по меньшей мере один пик, выбранный из 13,7, 14,5, 14,7, 15,0, 16,5, 17,8, 19,0, 19,4, 20,1 градуса два тета  $\pm 0,2$  градуса два тета.

Форма А может дополнительно характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или более пиков, выбранных из пиков, указанных в таблице 4.

Форма А может дополнительно характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей пики, указанные в таблице 4, причем относительная интенсивность пиков составляет более около 2%, предпочтительно более около 5%, более предпочтительно более около 10%, более предпочтительно более около 15%. Однако специалисту в данной области будет понятно, что относительная интенсивность пиков может варьироваться между различными образцами и различными измерениями на одном и том же образце.

Форма А также может характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, по существу такой, как показано на Фиг. 1.

В таблице 4 приведены перечень пиков и относительная интенсивность XPRD кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида (Фиг. 1).

Таблица 4

Положение [ $2\theta$ .]	Rel. инт. [%]
5,3965	16,30
7,1906	23,69
9,2513	8,14
9,4433	7,39
11,0719	11,34
11,9144	73,29
12,3921	29,17
12,5717	22,93
12,8791	8,93
13,6790	26,58
13,8694	15,67
14,4793	38,19
14,7398	55,26
14,9599	56,99

---

15,8715	20,66
16,4606	22,37
17,0459	20,43
17,4421	34,59
17,8203	46,78
18,2871	30,73
18,9573	43,91
19,4485	41,00
20,1190	35,53
20,7356	18,05
21,0535	30,09
21,6801	100,00
22,0236	18,06
22,7925	29,92
23,5044	41,92
23,9959	43,96
24,5555	31,47
25,1401	25,01
25,7588	59,24
26,0910	53,05
26,6137	39,47
27,5409	24,89
28,5493	22,44
29,1699	13,97
30,1441	21,01
31,2560	14,66
31,8783	16,47
32,7054	17,11
33,2797	24,40
33,9762	15,63

---

### Фармакология

Было установлено, что соединение по настоящему изобретению блокирует взаимодействие менина с белками MLL и онкогенными белками слияния MLL. Таким образом, соединение в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтические композиции, содержащие такое соединение, могут быть использованы в лечении или профилактике, в частности лечении таких заболеваний, как рак, включая, без ограничений, лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS) и миелопролиферативные новообразования (MPN); и диабет.

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике рака. В соответствии с одним вариантом осуществления формы рака, которые могут излечиваться с использованием ингибиторов взаимодействия менин/MLL по изобретению, включают лейкозы, лимфомы, миеломы или формы рака в виде солидной опухоли (например, рак предстательной железы, рак легких, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак печени, меланома и глиобластома и т. д.). В некоторых вариантах осуществления лейкозы включают в себя острые лейкозы, хронические лейкозы, миелоидные лейкозы, миелогенные лейкозы, лимфобластные лейкозы, лимфоцитарные лейкозы, острые миелогенные лейкозы (AML), хронические миелогенные лейкозы (CML), острые лимфобластные лейкозы (ALL), хронические лимфоцитарные лейкозы (CLL), Т-клеточные пролимфоцитарные лейкозы (Т-PLL), лейкоз из больших гранулярных лейкоцитов, волосатоклеточный лейкоз (HCL), лейкозы с перестройкой MLL, MLL-PTD лейкозы, MLL-амплифицированные лейкозы, MLL-позитивные лейкозы, лейкозы, проявляющие повышенные сигнатуры экспрессии гена *HOX/MEIS1*, и т. д.

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике миелодиспластического синдрома (MDS) или миелопролиферативных новообразований (MPN).

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике лейкозов, в частности нуклеофосмин (NPM1)-мутированных лейкозов, например NPM1c.

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике AML, в частности нуклеофосмин (NPM1)-мутированных AML (то есть NPM1<sup>mut</sup> AML), более конкретно сложных NPM1-мутированных AML.

5 В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике лейкозов с перестройкой MLL, в частности AML или ALL с перестройкой MLL.

10 В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике лейкозов с вариациями генов MLL, в частности AML или ALL с вариациями генов MLL.

В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть приемлемыми для дозирования 1 р/сут. (один раз в день).

15 В частности, соединение в соответствии с настоящим изобретением и его фармацевтические композиции могут быть использованы в лечении или профилактике гемобластоза у субъекта с мутациями гена NPM1 и/или вариациями гена недифференцированного лейкоза (*MLL*; *MLL1*; *KMT2A*), недифференцированного лейкоза (*MLL*), *MLL*-связанного лейкоза, *MLL*-ассоциированного лейкоза, *MLL*-положительного лейкоза, *MLL*-индуцированного лейкоза, недифференцированного лейкоза с перестройками гена, лейкоза, ассоциированного с *MLL*, перестройками/вариациями или перестройками/вариациями гена *MLL*, острого лейкоза, хронического лейкоза, миелодиспластического синдрома (MDS), миелопролиферативных новообразований (MPN), резистентности к инсулину, предиабета, диабета или риска диабета, гипергликемии, хромосомной перестройки на хромосоме 11q23, диабета 1-го типа, диабета 2-го типа; стимуляции пролиферации клетки поджелудочной железы, при этом клетка поджелудочной железы представляет собой островковую клетку, бета-клетку, свидетельством пролиферации бета-клеток является увеличение продукции бета-клеток или продукции инсулина; и для ингибирования взаимодействия менин-*MLL*, при этом целевым геном белка слияния *MLL* является *HOX* или *MEIS1* у человека.

20

25

30

Таким образом, изобретение относится к соединению по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению для получения лекарственного средства.

5 Настоящее изобретение также относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении, профилактике, облегчении, контроле или  
10 снижении риска расстройств, связанных с взаимодействием менина с белками MLL и онкогенными белками слияния MLL у млекопитающего, включая человека, лечение или профилактика которых находится под влиянием или осуществляется посредством блокировки взаимодействия менина с белками MLL и онкогенными белками слияния MLL.

Настоящее изобретение также относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства для лечения, профилактики,  
15 облегчения, контроля или снижения риска расстройств, связанных с взаимодействием менина с белками MLL и онкогенными белками слияния MLL у млекопитающего, включая человека, лечение или профилактика которых находится под влиянием или осуществляется посредством блокировки взаимодействия менина с белками MLL и онкогенными белками слияния MLL.

20 Изобретение также описывает соединение в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении или профилактике любого из заболеваний, упомянутых ранее в настоящем документе.

Изобретение также относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении или профилактике любого из заболеваний, упомянутых  
25 ранее в настоящем документе.

Изобретение также относится к применению соединения в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства для лечения или профилактики любого из заболеваний, упомянутых ранее в настоящем документе.

30 Соединение по настоящему изобретению может вводиться млекопитающим, предпочтительно людям, для лечения или профилактики любого из заболеваний, упомянутых ранее в настоящем документе.

С точки зрения применимости соединения в соответствии с настоящим изобретением приведен способ лечения теплокровных животных, включая людей, страдающих от любого из заболеваний, упомянутых ранее в настоящем документе.

5 Указанный способ включает введение, то есть системное или местное введение терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением теплокровным животным, включая людей.

10 Таким образом, изобретение также относится к способу лечения или профилактики любого из заболеваний, упомянутых ранее в настоящем документе, включающему введение терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением нуждающемуся в этом пациенту.

15 Специалист в данной области поймет, что терапевтически эффективным количеством соединения по настоящему изобретению является количество, достаточное для проявления терапевтической активности, и что это количество варьируется, *inter alia*, в зависимости от типа заболевания, концентрации соединения в терапевтическом составе и состояния больного. Терапевтически эффективное суточное количество будет составлять от около 0,005 мг/кг до 100 мг/кг. Количество соединения по настоящему изобретению, также называемого в данном документе активным ингредиентом, которое требуется для достижения терапевтически эффекта, может варьировать в каждом конкретном случае, например в зависимости от определенного соединения, способа введения, возраста и состояния реципиента, а также конкретного расстройства или заболевания, которое подлежит лечению. Способ лечения может также включать в себя введение активного ингредиента в режиме от одного до четырех введений в сутки. В данных способах лечения состав соединения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно готовят перед введением.

25 В настоящем изобретении также приведены композиции для профилактики или лечения заболеваний, упомянутых в настоящем документе. Указанные композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

30 Несмотря на то что активный ингредиент можно вводить отдельно, предпочтительно, чтобы он был представлен в форме фармацевтической композиции. Соответственно, в настоящем изобретении дополнительно представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по настоящему изобретению вместе с фармацевтически

приемлемым носителем или разбавителем. Носитель или разбавитель должны быть «приемлемыми» в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами композиции и не вредны для их реципиентов.

5 Фармацевтические композиции могут быть получены посредством любых способов, хорошо известных в области фармации, например с использованием таких способов, которые описаны в Gennaro et al. Remington's Pharmaceutical Sciences (18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, 1990, см., в частности Часть 8: Pharmaceutical preparations and their Manufacture).

10 Соединения по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Комбинированная терапия включает введение одной фармацевтической лекарственной формы, которая содержит соединение по настоящему изобретению и одного или более дополнительных терапевтических агентов, а также введение соединения по настоящему изобретению и каждого дополнительного терапевтического агента в своем отдельном  
15 фармацевтическом дозированном составе.

Таким образом, вариант осуществления настоящего изобретения относится к продукту, содержащему в качестве первого активного ингредиента соединение по настоящему изобретению и в качестве дополнительного активного ингредиента один или более  
20 противораковых агентов в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении пациентов, страдающих раком.

Один или более других медицинских агентов и соединение по настоящему изобретению могут вводиться одновременно (например, в виде отдельных или составных композиций) или последовательно в любом порядке. В последнем случае два  
25 или более соединений будут вводить в течение периода времени, и в количестве, и образом, которые достаточны для обеспечения достижения благоприятного или синергетического эффекта. Следует понимать, что предпочтительный способ и порядок введения, а также соответствующие дозировки и режимы дозирования для каждого компонента комбинации будут зависеть от конкретного другого медицинского агента и  
30 соединения по настоящему изобретению, способа их введения, конкретного состояния, в частности опухоли, которая подлежит лечению, и конкретного хозяина, который подлежит лечению.

## Фармакологические исследования

В приведенных ниже фармакологических исследованиях описаны следующие соединения: Соединение А: (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)-амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид;

Соединение А1: (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)-амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид · 2 HCl · x H<sub>2</sub>O (x = 2–3);

Соединение А3: Оксалатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)-амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

Соединение А4: Кристаллическая форма А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида

Результаты таких фармакологических исследований однозначно подтверждают биологическую активность (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси)бензамида.

### 1) Анализ гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) менина/МЛЛ

В необработанный белый 384-луночный микротитрационный планшет добавляли 40 нл 200X испытуемого соединения в DMSO и 4 мкл 2X менина, меченного хелатом тербия (получение см. ниже) в аналитическом буфере (40 мМ Трис HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT (дитиотреитол) и 0,05% Pluronic F-127). После инкубации тестируемого соединения и меченного хелатом тербия менина в течение 30 мин при температуре окружающей среды добавляли 4 мкл 2X пептида FITC-MBM1 (FITC-β-аланин-SARWRFPARPGT-NH<sub>2</sub>) («FITC» означает флуоресцеин изотиоцианат) в аналитическом буфере, микротитрационный планшет центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин, а смеси для анализа инкубировали в течение 15 мин при температуре окружающей среды. Относительное количество комплекса менин·FITC-MBM1 в аналитической смеси определяют посредством измерения гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) пары донорный/акцепторный флуорофор тербия/FITC с помощью считывателя микропланшетов EnVision (длина волны возбуждения 337 нм / длина

волны излучения тербия 490 нм / длина волны излучения FITC 520 нм) при температуре окружающей среды. Степень резонансного переноса энергии флуоресценции (величина HTRF) выражается как отношение интенсивностей флуоресцентного излучения флуорофоров FITC и тербия ( $F^{em} 520 \text{ нм} / F^{em} 490 \text{ нм}$ )

5 Конечные концентрации реагентов в анализе связывания: 200 пМ меченного хелатом тербия менина, 75 нМ пептида FITC-MBM1 и 0,5% DMSO в аналитическом буфере. Титрование исследуемых соединений по принципу «доза-ответ» проводится по 11-точечной схеме четырехкратного последовательного разведения, начиная, как правило, с 10 мкМ.

10 Эффективность соединения определяли путем первого вычисления % ингибирования в каждой концентрации соединения в соответствии с уравнением 1:

$$\% \text{ ингибирования} = ((\text{НС} - \text{LC}) - (\text{HTRF}^{\text{соединения}} - \text{LC})) / (\text{НС} - \text{LC}) * 100 \quad (\text{уравнение 1}),$$

где LC и НС представляют собой значения HTRF для анализа в присутствии или в  
15 отсутствие насыщающей концентрации соединения, которое конкурирует с FITC-MBM1 за связывание с менином, и  $\text{HTRF}^{\text{соединения}}$  представляет собой измеренное значение HTRF в присутствии тестируемого соединения. Значения НС и LC HTRF представляют собой среднее значение по меньшей мере 10 повторов на один планшет. Для каждого тестируемого соединения строили график зависимости % ингибирования  
20 от логарифма концентрации тестируемого соединения, а значение IC50 получали в результате подгонки этих данных под уравнение 2:

$$\% \text{ ингибирования} = \text{Низ} + (\text{Верх} - \text{Низ}) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - \log[\text{соед}]) * h))} \quad (\text{уравнение 2}),$$

где «Низ» и «Верх» являются нижней и верхней асимптотами кривой доза-ответ соответственно, IC50 — концентрация соединения, обеспечивающая 50%-ное  
25 ингибирование сигнала,  $h$  — коэффициент Хилла.

Подготовка мечения менина криплатом тербия. Менин (метка 1-610-6xhis, 2,3 мг/мл в 20 мМ Neres (2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил]этансульфоновая кислота), 80 мМ NaCl, 5 мМ DTT (дитиотреитол), pH 7,5) метили криплатом тербия следующим  
30 образом. 200 мкг менина подвергали замене буфера в 1х буфере Neres. 6,67 мкМ менина инкубировали с 8-кратным молярным избытком NHS (N-гидроксисукцинимид)-тербия криплатом в течение 40 минут при комнатной температуре. Половину меченого белка очищали от свободной метки путем проведения реакции над колонкой NAP5 с

буфером для элюирования (0,1 М HEPES, pH7 + 0,1% BSA (бычий сывороточный альбумин)). Другую половину элюировали 0,1 М фосфатно-солевым буфером (PBS), pH7. Было собрано 400 мкл элюента для каждой аликвоты и заморожено при -80 °С. Конечная концентрация белка менина, меченного тербием, составляла 115 мкг/мл в буфере HEPES и 85 мкг/мл в буфере PBS соответственно.

*Белковая последовательность менина (SEQ ID NO: 1):*

MGLKAAQKTLFPLRSIDDVVRLFAAELGREEPDLVLLSLVLGFVEHFLAVNRVIPTNV  
 PELTFQSPAPDPPGGLTYFPVADLSIIAALYARFTAQIRGAVDLSLYPREGGVSSREL  
 10 VKKVSDVIWNSLSRSYFKDRAHIQSLFSFITGTKLDSSGVAFVVGACQALGLRDVH  
 LALSEDHAWVVFPGNGEQTA EVTWHGKGNEDRRGQTVNAGVAERSWLYLKGSYM  
 RCDRKMEVAFMVCAINPSIDLHTDSLELLQLQKLLWLLYDLGHLERYPMALGNLA  
 DLEELEPTPGRPDPLTYLHKGIASAKTYRDEHIYPYMYLAGYHCRNRNVREALQA  
 WADTATVIQDYNCREDEEIYKEFFEVA NDVIPNLLKEAASLLEAGEERPGEQSQGT  
 15 QSQGSALQDPECFAHLLRFYDGICKWEEGSPTPVLHVGWATFLVQSLGRFEGQVRQK  
 VRIVSREAEAAEAEERPWGEEAREGRRRGPRRESKPEEPPPPKPPALDKGLGTGGQAV  
 SGPPRKPPGTVAGTARGPEGGSTAQVPAPAASPPPEGPVLTQSEKMKGMKELLVAT  
 KINSSAIKLQLTAQSQVQMKKQKVSTPSDYTLSFLKRQRKGLHHHHHH

## 2a) Анализ пролиферации

Антипролиферативный эффект тестируемых соединений ингибиторов белок-белкового взаимодействия менин/MLL оценивали в клеточных линиях лейкоза человека. Клеточная линия MOLM-14 имеет транслокацию MLL и экспрессирует слитый с MLL белок MLL-AF9 соответственно, как и белок дикого типа из второго аллеля. Также были протестированы клетки OCI-AML3, несущие мутацию гена NPM1c. Клеточные линии с перестройкой MLL (например, MOLM-14) и клеточные линии с мутацией NPM1c демонстрируют сигнатуры экспрессии гена HOXA/MEIS1, как у стволовых клеток. В качестве контрольной линии клеток, содержащей два аллеля дикого типа *MLL (KMT2A)*, использовали КО-52, чтобы исключить соединения, проявляющие общее цитотоксическое действие.

Клетки MOLM-14 выращивали в среде RPMI-1640 (Sigma Aldrich) с добавлением 10% теплоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HyClone), 2 мМ L-глутамин (Sigma Aldrich) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco). Линии клеток КО-52 и OCI-AML3

размножали в альфа-MEM (Sigma Aldrich) с добавлением 20% теплоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HyClone), 2 mM L-глутамина (Sigma Aldrich) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco). В процессе культивирования количество клеток поддерживалось на уровне 0,3–2,5 млн. клеток в мл, а число пассажей не превышало 20.

- 5 Для оценки антипролиферативных эффектов 200 клеток MOLM-14, 200 клеток OCI-AML3 или 300 клеток KO-52 высевали в 200 мкл среды на лунку в 96-луночные круглодонные планшеты со сверхнизкой фиксацией (Costar, каталожный номер 7007). Количество клеток для посева выбирали на основе кривых роста для обеспечения линейного роста на протяжении всего эксперимента. Исследуемые соединения
- 10 добавляли в различных концентрациях, содержание DMSO нормировали к 0,3%. Клетки инкубировали в течение 8 суток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Рост сфероидов измеряли в режиме реального времени с помощью визуализации живых клеток (IncuCyteZOOM, Essenbio, 4-кратный объектив), получая изображения на 8-й день. Конфлюэнтность (%) как показатель размера сфероида определяли с помощью встроенного аналитического
- 15 инструмента
- Для того чтобы определить влияние исследуемых соединений с течением времени, в каждой лунке рассчитывали конфлюэнтность как меру размера сфероидов. В качестве исходного уровня для LC (низкий контроль) использовали конфлюэнтность при
- 20 наибольшей дозе эталонного соединения, а конфлюэнтность клеток, обработанных DMSO, использовали как 0% цитотоксичности (НС, высокий контроль). Абсолютные значения IC<sub>50</sub> рассчитывали как процент изменения конфлюэнтности следующим образом:
- LC = низкий контроль: клетки, обработанные, например, 1 мкМ цитотоксического агента стауроспорина, или, например, клетки, обработанные высокой концентрацией
- 25 альтернативного эталонного соединения;
- НС = высокий контроль: средняя конфлюэнтность (%) (клетки, обработанные DMSO);
- $\% \text{ эффекта} = 100 - (100 * (\text{образец-LC}) / (\text{НС-LC}));$  и
- 30 для расчета IC<sub>50</sub> использовали GraphPad Prism (версия 7.00). Для построения графика зависимости % эффекта от Log<sub>10</sub> концентрации соединения использовали уравнение «доза-ответ» с переменным наклоном и фиксацией максимума на 100%, а минимума на 0%.

2b) Анализ экспрессии мРНК MEIS1

Экспрессию мРНК MEIS1 при обработке соединением исследовали методом QuantiGene Singleplex (Thermo Fisher Scientific). Эта технология позволяет проводить прямое количественное определение мРНК-мишеней с помощью зондов, гибридизирующихся с определенными интересующими последовательностями мишеней, а сигнал детектируется с помощью многорежимного планшетного ридера Envision (PerkinElmer). Для данного эксперимента использовали клеточную линию MOLM-14. Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 3750 клеток на лунку в присутствии возрастающих концентраций соединений. После 48-часовой инкубации с соединениями клетки лизировали в буфере для лизиса и инкубировали в течение 45 минут при 55 °С. Лизаты клеток смешивали со специфическим зондом захвата MEIS1 человека или специфическим зондом RPL28 (Ribosomal Protein L28) человека в качестве контроля нормализации, а также с блокирующими зондами. Впоследствии лизаты клеток переносили в гибридизационный планшет Custom Assay (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 18–22 часов при 55 °С. Затем планшеты промывали для удаления несвязанных материалов и последовательно добавляли преамплификаторы, амплификаторы и меченый зонд. Сигналы (= количество генов) измеряли с помощью многорежимного планшетного ридера Envision. IC<sub>50</sub> рассчитывали методом моделирования доза-ответ с использованием соответствующего программного обеспечения. Для всех генов, не являющихся домашними генами, ответ равнялся подсчетам с поправкой на фон и относительную экспрессию. Для каждого образца сигнал каждого исследуемого гена (с вычитанием фона) делился на сигнал нормализующего гена (RPL28: с вычитанием фона). Кратность изменения рассчитывали путем деления нормализованных значений для обработанных образцов на нормализованные значения для образца, обработанного DMSO. Кратность изменения каждого целевого гена использовали для расчета IC<sub>50</sub>.

Результаты измерения представлены ниже в таблице 5.

**Таблица 5. Биологические данные – анализы HTRF, пролиферации и экспрессии мРНК MEIS1**

Номер соединения	HTRF – инкубация 30 мин IC <sub>50</sub> (нМ)	MEIS1 IC <sub>50</sub> (мкМ)	анализ сфероидов_OneTime MOLM-14 IC <sub>50</sub> (мкМ)	OCI-AML3 IC <sub>50</sub> (мкМ)	анализ сфероидов_OneTime КО-52 IC <sub>50</sub> (мкМ)
A	0,09	0,02	0,021	0,091	6,85

Номер соединения	HTRF – инкубация 30 мин IC <sub>50</sub> (нМ)	MEIS1 IC <sub>50</sub> (мкМ)	анализ сфероидов_OneTime MOLM-14 IC <sub>50</sub> (мкМ)	OCI-AML3 IC <sub>50</sub> (мкМ)	анализ сфероидов_OneTime KO-52 IC <sub>50</sub> (мкМ)
A3	0,098	0,017	0,017	0,12	7,75
A1	0,18	0,017	0,011	0,08	
A4		0,011	0,008	0,019	5,44

### 3) ФК мыши (*In vivo* $T_{1/2}$ и пероральная биодоступность)

Фармакокинетику (ФК) *in vivo* оценивали натошак у мышей-самцов линии CD-1 (возраст 6–8 недель) после однократного внутривенного (в/в, 0,5 или 1,0 мг/кг при введении 2,5 мл/кг) или перорального (п/о, 5 мг/кг при введении 10 мл раствора/кг) введения исследуемого препарата в 20% (масс:об) растворе HP-β-CD или в апирогенной воде.

Образцы плазмы и/или цельной крови собирали из дорсальной плюсневой вены в нужные моменты времени посредством серийного капиллярного микрозабора (около 0,03 мл) с использованием EDTA в качестве антикоагулянта. Концентрации соединения в образцах плазмы и крови анализировали квалифицированным методом ЖХ-МС/МС. *In silico* анализ основных фармакокинетических параметров проводился с использованием WinNonlin (Phoenix™, версия 6.1) или аналогичного программного обеспечения.

### 4) Метаболическая стабильность в микросомах печени человека/мыши

#### Процедура эксперимента

Целью данного исследования является измерение *in vitro* метаболической стабильности тестируемого (-ых) соединения (соединений) в микросомах печени человека и мыши и получение количественной информации о скорости метаболического оборота (т. е. определение кажущегося собственного клиренса исследуемого соединения).

Испытуемые образцы готовили в маточной концентрации 10 мМ в DMSO. Для определения метаболического оборота готовили рабочий раствор, добавляя 2 мкл 10 мМ DMSO маточного раствора исследуемого соединения или положительного контроля к 198 мкл ацетонитрила (конечная концентрация 100 мкМ).

Инкубацию проводили следующим образом: Сначала микросомы печени размораживали на льду и готовили мастер-раствор, содержащий микросомы печени в

100 мМ PBS (фосфатно-солевом буферном растворе) при рН 7,4. Затем в инкубационные планшеты добавляли раствор микросом печени и 10 мМ NADPH (никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат) (ММ: 833,4 г/моль; Roche Diagnostics GmbH, Германия. Растворяли в фосфатном буфере (100 ммоль/л, рН 7,4). Смесь

5 перемешивали в течение 10 секунд и предварительно нагревали в инкубационном планшете при 37 °С в течение 10 минут. Для начала метаболической реакции в инкубационный планшет добавляли 5 мкл 100 мкМ рабочего раствора исследуемого соединения или соединений положительного контроля (конечная концентрация исследуемого вещества = 1 мкМ). Конечная реакционная смесь должна содержать 1 мМ

10 NADPH, 0,5 мг/мл белка микросом и 1 мкМ исследуемого соединения или соединения положительного контроля в 100 мМ PBS при рН 7,4. Процентное содержание органического растворителя в инкубационной смеси составляет 1% с DMSO ≤ 0,02%.

Реакцию гасили, перенося 50 мкл инкубируемой смеси в выбранные моменты времени в планшет для гашения, содержащий 200 мкл холодного метанола. После отбора проб

15 во все моменты времени планшет для гашения центрифугировали при 4000 об/мин в течение 40 минут для осаждения белка. В общей сложности 90 мкл супернатанта переносили в аналитический планшет и добавляли в каждую лунку сверхчистую воду H<sub>2</sub>O для проведения анализа ЖХ/МС/МС. Все инкубации и анализ выполняли в двух повторностях.

20

#### Анализ данных

Все расчеты проводили с использованием Microsoft Excel. Величину наклона, *k*, определяли путем линейной регрессии натурального логарифма остаточного процента материнского препарата по отношению к кривой времени инкубации. Результаты

25 измерения представлены ниже в таблице 6.

Период полувыведения *in vitro* (*in vitro*  $t_{1/2}$ ) определяли по величине наклона:

$$in\ vitro\ t_{1/2} = -(0,693 / \text{наклон})$$

Конверсию *in vitro*  $t_{1/2}$  (в мин) в *in vitro* собственный клиренс (*in vitro*  $Cl_{\text{собств}}$ , в мкл/мин/мг белков) выполняли с использованием следующего уравнения:

$$in\ vitro\ Cl_{\text{собств}} = \left( \frac{0,693}{t_{1/2}} \right) * \left( \frac{\text{объем инкубации (мкл)}}{\text{объем белков (мг)}} \right)$$

30

Таблица 6. ФК и метаболическая стабильность у мышей

№ примера	Реагент	In vivo T <sub>1/2</sub> (IV) (ч)	Биодоступность (PO) (%)	Способств микросом печени человека (мкл/мин/мг)	Способств микросом печени мыши (мкл/мин/мг)
<b>A</b>	HP-β-CD	6,7	17	19	< 7,5
<b>A3</b>	Апирогенная вода	9,0	34	19	< 7,5
<b>11</b>	HP-β-CD	N/A	N/A	14	< 7,5

«N/A» — не анализировали

5) Протокол определения фармакодинамической (ФД) активности в подкожных (п/к или П/К) ксенотрансплантатах клеток MOLM-14 или OCI-AML3

*Исследуемые агенты и контроли*

Соединение A3 готовили в 20% гидроксипропил-бета-циклодекстрине (HP-β-CD) и получали в общем объеме, достигающем 0,2 мл (10 мл/кг) на дозу для животного массой 20 г. Дозы корректировали по индивидуальной массе тела каждый день.

10 Рабочие исходные растворы соединения A3 готовили один раз в неделю для каждого исследования и хранили при комнатной температуре. Соединение A3 вводили перорально (п/о) ежедневно.

*Анализ*

15 Фармакодинамическую активность (ФД) соединений *in vivo* оценивали в подкожных ксенотрансплантатах клеток MOLM-14 или клеток OCI-AML3. Бестимусных мышей NMRI (CrI:NMRI-Foxn1nu/-), имеющих опухоли MOLM-14 или OCI-AML3, обрабатывали 3 суточными дозами носителя или соединений. Образцы плазмы собирали через 23 часа после введения дозы на второй день, через 0,5 часа после введения конечной дозы и через 16 часов после введения конечной дозы, а образцы

20 опухоли — через 16 часов после введения конечной дозы. Для изучения влияния соединений на экспрессию множества генов-мишеней менин-MLL (например, MEIS1, MEF2C, FLT3) использовали технологию QuantiGene Plex (Thermo Fisher Scientific). Замороженные опухоли гомогенизировали, переносили в отдельные пробирки с лизирующими матрицами в буфере для лизиса и инкубировали в течение 30 минут при

25 55 °C. Лизаты клеток смешивали с захваченными зондами, гранулами Luminex и блокирующими зондами, переносили в гибридизационный планшет Custom Assay (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 18–22 часов при 54 °C. Затем

планшеты переносили на магнитный сепарационный планшет и промывали для удаления несвязанных материалов с гранул с последующей последовательной гибридизацией преамплификаторов, усилителей и меченого зонда и последующим связыванием фикоэритрина со стрептавидином. Сигналы с гранул измеряли с помощью трехмерного прибора LumineX FlexMap. Для всех генов, не являющихся домашними генами, ответ равнялся подсчетам с поправкой на фон и относительную экспрессию. Для каждого образца сигнал каждого исследуемого гена (с вычитанием фона) делился на сигнал нормализующего гена (RPL19, RPL28, ATP6V1A : с вычитанием фона). Кратность изменения рассчитывали путем деления нормализованных значений для обработанных образцов на нормализованные значения для образца, обработанного DMSO. Полученные результаты показаны в таблицах 7 и 8.

**Таблица 7. Уровень экспрессии (% относительно носителя) выбранных генов из модели MOLM-14 п/к (средние значения и стандартные отклонения)**

Соединение АЗ (мг/кг)	MEIS1	FLT3	MEF2C
0	101,30 ± 15,06	104,80 ± 10,07	103,50 ± 11,02
3	83,49 ± 25,48	78,67 ± 20,74	85,50 ± 22,77
10	62,84 ± 4,06	74,91 ± 8,97	68,04 ± 14,43
30	23,16 ± 2,75	52,61 ± 4,51	27,83 ± 2,17
50	14,40 ± 3,39	36,14 ± 3,50	18,75 ± 2,38
100	10,97 ± 3,21	35,82 ± 1,10	14,18 ± 1,56

**Таблица 8. Уровень экспрессии (% относительно носителя) выбранных генов из модели OCI-AML3 п/к (средние значения и стандартные отклонения)**

Соединение АЗ (мг/кг)	MEIS1
0	100,30 ± 8,53
3	87,90 ± 39,75
10	48,81 ± 15,30
30	32,66 ± 3,71
50	23,83 ± 1,34
100	16,76 ± 1,92

В таблицах 7а и 8а показаны медианные значения на основе повторных экспериментов в оптимизированных условиях со свежими образцами опухолей.

**Таблица 7а. Уровень экспрессии (% относительно носителя) выбранных генов из модели MOLM-14 п/к (медианные значения и стандартные отклонения)**

<b>Соединение АЗ (мг/кг)</b>	<b>MEIS1</b>	<b>FLT3</b>	<b>MEF2C</b>
0	100,0 ± 13,5	100,0 ± 10,1	100,0 ± 11,0
3	83,7 ± 22,8	89,2 ± 20,7	87,7 ± 22,8
10	49,3 ± 5,9	79,8 ± 9,0	64,6 ± 14,4
30	14,7 ± 3,9	54,5 ± 4,5	28,8 ± 2,2
50	4,7 ± 1,1	37,6 ± 3,5	18,8 ± 2,4
100	3,3 ± 1,4	35,4 ± 1,1	13,6 ± 1,6

**Таблица 8а. Уровень экспрессии (% относительно носителя) выбранного гена из модели OCI-AML3 п/к (медианные значения и стандартные отклонения)**

5

<b>Соединение АЗ (мг/кг)</b>	<b>MEIS1</b>
0	100,0 ± 11,2
3	71,2 ± 15,1
10	26,5 ± 4,3
30	25,1 ± 11,2
50	8,5 ± 2,2
100	9,4 ± 1,2

*6) Исследование эффективности в подкожной модели MOLM-14*

*Исследуемые агенты и контроли*

10 Соединение АЗ готовили в 20% гидроксипропил-бета-циклодекстрине (HP-β-CD) и получали в общем объеме, достигающем 0,2 мл (10 мл/кг) на дозу для животного массой 20 г. Дозы корректировали по индивидуальной массе тела каждый день. Рабочие исходные растворы соединения АЗ готовили один раз в неделю для каждого исследования и хранили при температуре 25 °С.

*Животные*

Использовали самок бестимусных мышей NMRI (MOLM-14 SC) в возрасте приблизительно 6–8 недель и с весом приблизительно 25 г. Всем животным давали возможность акклиматизироваться и восстановиться после стресса, связанного с транспортировкой, в течение по меньшей мере 7 дней до использования в эксперименте. В свободном доступе предоставляли автоклавированную воду и обработанный облучением корм и животных содержали в 12-часовом цикле свет/темнота. Клетки, подстилку и бутылки для воды автоклавировали перед применением и меняли еженедельно. Дополнительные подробности приведены ниже в таблице 9.

**Таблица 9. Культура тканей и реагенты для инъекций клеток**

DPBS (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко)
Теплоинактивированная фетальная бычья сыворотка
Среда RPMI 1640
L-глутамин
Гентамицин
Колба для культивирования T175
Роллерный флакон

*Модель опухоли и способ культивирования клеток*

Клетки AML MOLM-14 человека культивировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в указанной полной культуральной среде (RPMI 1640 + 10% HI-FBS + 2 mM L-глутамин + 50 мкг/мл гентамицина). Клетки собирали при логарифмическом росте и ресуспендировали в холодной (4 °C) бессывороточной среде, разработанной в Онкологическом институте имени Розуэлла Парка (RPMI)1640.

Каждой мыши в правый бок вводили 5 × 10<sup>6</sup> клеток MOLM-14 в 50% матригеле общим объемом 0,2 мл с помощью шприца объемом 1 куб. см и иглы 27-го калибра.

### *Дизайн исследования*

Соединение АЗ вводили перорально (п/о) ежедневно.

День 0 представляет собой день имплантации опухолевых клеток и начала исследования.

- 5 Мышей, несущих п/к опухоли MOLM-14, рандомизировали на 16 день после имплантации опухоли и назначали экспериментальные группы в соответствии с объемом опухоли (среднее значение  $\sim 130 \text{ мм}^3$ ;  $n = 10/\text{группу}$ ) Лечение носителем или соединением АЗ (при 30 и 100 мг/кг) начинали в тот же день с ежедневным пероральным введением дозы в течение 21 дня. Плазму собирали через 1, 2, 4, 8 и 23  
10 часа после последней дозы ( $n = 4\text{--}5/\text{группу/временную точку}$ ) для анализа ФК (фармакокинетики).

### *Наблюдение за животными*

- 15 Объем п/к опухоли измеряли для каждого животного 2–3 раза в неделю или более в течение всего исследования.

### *Расчеты*

Объем опухоли рассчитывали по формуле:

- 20  $\text{объем опухоли (мм}^3) = (D \times d^2 / 2)$ , где «D» обозначает наибольший диаметр, а «d» наименьший диаметр опухоли, определяемые по измерениям штангенциркулем. Данные объема опухоли графически отображали как средний объем опухоли  $\pm$  станд. ош. среднего (СОС).

- % $\Delta$ TGI определяли как разность между средней опухолевой нагрузкой группы лечения и контрольной группы, рассчитываемую по формуле  
25  $\% \Delta \text{TGI} = [(TV_c TV_{c0})(TV_t TV_{t0})] / (TV_c TV_{c0}) \times 100$ , где «TV<sub>c</sub>» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TV<sub>c0</sub>» представляет собой среднюю начальную опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TV<sub>t</sub>» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в экспериментальной группе, а «TV<sub>t0</sub>» представляет собой среднюю исходную опухолевую нагрузку в  
30 экспериментальной группе. % TGI определяли как разность между средними объемами опухолей групп лечения и контрольных групп рассчитываемую следующим образом:

$\%TGI = ((TV_c TV_t) / TV_c) \times 100$ , где « $TV_c$ » представляет собой средний объем опухоли контрольной группы, а « $TV_t$ » представляет собой средний объем опухоли экспериментальной группы. В соответствии с критериями Национального онкологического института  $TGI \geq 60\%$  считается биологически значимым.

- 5 % регрессии опухоли (TR), количественно определяемый для отражения связанного с лечением снижения объема опухоли по сравнению с исходным уровнем, независимо от исходного уровня контрольной группы, рассчитывали как  $\%TR = (1 - \text{среднее } (TV_{ti} / TV_{t0i})) \times 100$ , где « $TV_{ti}$ » представляет собой опухолевую нагрузку отдельных животных в экспериментальной группе, а « $TV_{t0i}$ » представляет собой начальную опухолевую
- 10 нагрузку животного.

### *Анализ данных*

Объем опухолей наносили на график с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad версии 7 или 8). Статистическую значимость для большинства исследований оценивали для групп, получавших соединение АЗ, по сравнению с контрольными группами, получавшими носитель НРβCD, в последний день исследования, когда в каждой группе оставались 2/3 или более мышей. Различия между группами считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

15

Статистическую значимость для объема опухоли животного рассчитывали на основании линейной модели со смешанными эффектами (LME) с помощью программного обеспечения R вер. 3.4.2 (с использованием приложения Shiny вер. 4.0 собственной разработки Janssen), при этом лечение и время рассматривались в качестве фиксированных эффектов, а животные — как случайный эффект. Логарифмическое преобразование выполняли, если отдельные продольные траектории ответа были

20

25 нелинейными.

Информацию, полученную в рамках данной модели, использовали для проведения попарных сопоставлений лечения объемов опухолей с контрольной группой или между всеми экспериментальными группами. Результаты представлены на **Фиг. 2**.

- 30 7) *Кардиоэлектрофизиологические эффекты исследуемых соединений в синхронно бьющихся кардиомиоцитах, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека (hSC-CM), с использованием  $Ca^{2+}$ -флуоресцентного анализа (CTCM человека)*

*Протокол*

Соединения тестировали в 96-луночных планшетах.

Соединения тестировали в концентрации 0,1 мкМ, 0,2 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2,5 мкМ и 5 мкМ (n = 4 на дозу) на Cor.4U®-Cardiomyocytes или iCell® Cardiomyocytes2.

- 5 Альтернативно, соединения тестировали в концентрации 0,1 мкМ, 0,3 мкМ; 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ и 30 мкМ (n = 4 на дозу), в основном на iCell® Cardiomyocytes2.

Положительные и отрицательные контроли

Дофетилид при 3 нМ

Изопротеренол при 100 нМ

- 10 Нимодипин при 100–300 нМ

Цетирезин при 3 мкМ.

Контрольный носитель: диметилсульфоксид (DMSO). Растворы соединения в DMSO или его растворителе (конечная концентрация 0,1% DMSO; n = 8).

- 15 *Приготовление исследуемого вещества и контролей*

Тестируемые соединения растворяли в DMSO в 1000-кратных планируемых концентрациях. Был изготовлен «материнский планшет», содержащий исследуемые соединения, а также положительные и отрицательные контроли в 1000-кратных конечных концентрациях. В день эксперимента эти исходные растворы разводили раствором Tyrode (Sigma), дополненным 10 мМ HEPES (Gibco), до 2-кратной концентрации (в круглодонных планшетах для соединений). Конечная концентрация DMSO в испытуемых растворах и контрольном носителе составляла 0,1%.

*Клетки*

- 25 hSC-СМ (Cor.4U® Cardiomyocytes) получали из CDI (Ncardia, Германия). Клетки предварительно размножают и высевают в покрытые фибронектином 96-луночные планшеты с плотностью, достаточной для формирования монослоя, и поддерживают в культуре в инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в соответствии с инструкциями поставщика клеток.

- 30 Кардиомиоциты второй линии, полученные из hSC, под названием iCell® Cardiomyocytes2, были приобретены у компании FUJIFILM Cellular Dynamics (США).

Эксперименты с исследуемыми препаратами проводят через 5–7 дней после высадки клеток на планшет, чтобы получить живой, бьющийся монослой hiPSC-производных кардиомиоцитов. Монослой бьющихся клеток в 96-луночных планшетах обычно берут из 2 флаконов замороженных кардиомиоцитов iCell®2 ( $\approx 5$  млн. клеток/флакон),  
 5 которые будут внесены у три 96-луночных планшета ( $\approx 50$ К/лунку).

### *Перед началом эксперимента*

По меньшей мере за час до начала экспериментов обычную клеточную среду заменяли раствором Тироде с кальциевым красителем (см. ниже).  
 10 Краситель Cal 520 (AAT Bioquest) растворяли в 11 мл раствора Тироде с добавлением 10 мМ HEPES и нагревали до 37 °С перед добавлением к клеткам.  
 Из каждой лунки удаляли 35 мкл клеточной культуральной среды, и заменяли ее 35 мкл предварительно прогретого раствора красителя Cal 520, и инкубировали планшет с клетками в течение 45 мин при 37 °С / 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали в течение 5 мин  
 15 при 37 °С.

### *Эксперимент*

Спонтанная электрическая активность регистрируется с помощью сигнализации флуоресцентного кальциевого красителя Cal520™ (AAT Bioquest). Этот краситель  
 20 интегрирует общую внутриклеточную активность кальция по всей лунке. Флакон красителя Cal520 (50 мкг, ММ: 1103/моль) растворяют в 50 мкл DMSO для получения исходного раствора 0,9 мМ. 50 мкл исходного раствора красителя добавляли к 10 мл раствора Тироде для получения концентрации красителя 4,5 мкМ. Затем в каждую лунку добавляли 35 мкл раствора красителя, чтобы получить конечную концентрацию  
 25 красителя 1,58 мкМ. Текущий протокол окрашивания для этого анализа СТСМ человека был разработан недавно (Ivan Kopljar et al, Journal of Pharmacological and toxicological methods 2018. 91: 80-86; Lu et al., Tox Sci 2019. 170 (2): 345-356).  
 Флуоресцентные сигналы (морфология транзиента Ca<sup>2+</sup>) измеряли с помощью системы Functional Drug Screen System (FDSS/μCell; Hamamatsu, Япония) и последующий анализ  
 30 записей проводили в автономном режиме с использованием соответствующего программного обеспечения, например Notocord.

Планшет с клетками загружали в FDSS/μCell для прогона: Транзиенты Ca<sup>2+</sup> измеряли в течение 4 минут для проверки синхронного биения кардиомиоцитов в каждой лунке.

Все 96 лунок измеряли одновременно (интервалы отбора проб: 0,06 с, короткое время воздействия: 10 мс; длина волны возбуждения 480 нм; длина волны излучения 540 нм; FDSS/ $\mu$ Cell нагревали до 37 °C). Когда все показывали синхронное биение, 96-луночный планшет измеряли повторно 3 раза (для проверки синхронного биения во  
 5 всех 96 лунках на исходном уровне, не соответствующие заданным критериям лунки исключались из исследования и не обрабатывались соединением):

T = 0: период контроля (от -5 до -1 мин) + добавление соединения, последующее в течение 3 мин

T = 30: измерено от 29 до 34 мин после добавления соединения

10 На стадии добавления соединения 100 мкл соответствующих дважды концентрированных тестовых растворов одновременно пипетировали в каждую лунку. Данные анализировали в автономном режиме с использованием соответствующего программного обеспечения, например Notocord-Нem (версия 4.3).

Измерялись следующие параметры морфологии транзиентов  $\text{Ca}^{2+}$ :

15 скорость биения (BR)

амплитуда транзиента  $\text{Ca}^{2+}$  (Amp)

STD<sub>90</sub>: длительность транзиента  $\text{Ca}^{2+}$  при 90% (время до 90% от исходного базового значения).

20 Присутствие различных «подобных аритмии» активностей также было отмечено в течение экспериментальных периодов. Они включали:

«ранние последеполаризационные» (EAD-подобные) события (определяются как «дополнительный небольшой пик формы сигнала транзиента, следующий за начальным пиком транзиента»);

25 «подобные желудочковой тахикардии» (VT-подобные) события (определяемые как очень высокая скорость биения) или

«события, подобные фибрилляции желудочков» (VF-подобные) (определяются как «формы сигнала  $\text{Ca}^{2+}$  малой амплитуды, высокой скорости с нерегулярностями и неизмеряемыми переходными потенциалами»)

«прекращение биения» клеток (транзиенты  $\text{Ca}^{2+}$  не наблюдаются).

Если вызванные соединениями изменения сигнала кальциевого транзientа не могли быть проанализированы программным обеспечением, то эти сигналы идентифицировались как «ниже уровня качественного анализа» (BQL).

## 5 *Анализ данных*

Данные, измеренные с FDSS- $\mu$ Cell, копировались для автономного анализа, анализировались и загружались в SPEC-II (наша система оперативного управления) для дальнейшего анализа. Значения переменных до и после введения препарата были собраны и перенесены в рабочую книгу Excel.

- 10 Все значения (фактические единицы и процентные изменения по сравнению с исходными значениями) выражены в виде медианы (минимальной и максимальной). Изменения по сравнению с соответствующими исходными значениями (в фактических единицах), наблюдаемые в группе соединения, сравнивали с изменениями в группе контроля с растворителем с помощью теста Вилкоксона — Манна — Уитни.
- 15 Проводились двухфакторные тесты с поправкой на множественность Бонферрони. Поскольку в каждой из 10 экспериментальных групп по сравнению с группой растворителя, альфа-уровень 0,05/10 (0,005) считался отражающим статистически значимое отличие от группы растворителя. Все статистические анализы выполняли с использованием соответствующего программного обеспечения, например программы R
- 20 версии 3.5.2.

Контроль качества hiPSC-СМ на планшете:

Планшеты отклоняли, если они не соответствовали следующим критериям:

Стабильное равномерное биение

Амплитуда  $> 500$  относительных единиц

- 25 Скорость биения от 25 до 80 ударов в минуту

STD<sub>90</sub> от 300 до 800 мс.

В настоящем исследовании hiPSC-СМ в планшетах соответствовали указанным выше критериям.

- 30 Эти параметры в сочетании с частотой аритмии или прекращения биения использовали для расчета потенциального уровня риска с использованием взвешенного метода оценки (на основании Koplar et al., stem Cell Reports 2018. 11, 1365-1377). Этот

показатель опасности рассчитывается для каждой концентрации путем сложения взвешенных баллов, основанных на интервалах толерантности (TI) по изменению  $STD_{90}$ , частоты и амплитуды биений ( $\Delta\Delta\%$ ), а также частоты остановки биений и ранней следовой деполяризации (EAD) Следовательно, для каждой концентрации будет сгенерировано одно из четырех различных уровней опасности. Это будет проводиться после 30-минутной инкубации с соединением. Уровни опасности представляют собой:

5 Опасность отсутствует: в пределах уровней воздействия носителя или небольшие нерелевантные изменения.

Низкая опасность: значимый эффект, но потенциально низкий риск возникновения кардиологических обязательств.

10

Высокая опасность: относительно высокий риск возникновения кардиологических обязательств.

Очень высокая опасность: очень высокий риск из-за аритмоподобных событий (EAD).

Результаты по шкале «Оценка опасности» позволяют выявить возможные острые кардиоиндуцированные эффекты при свободном лекарственном эквиваленте (*так как в лунки не добавляются белки плазмы*). Оценку идентификации опасности проводят с использованием «справочника по подсчету баллов», который называется *STEM\_Cell\_Scoring\_version 1* (Kopljar et al., Stem Cell Reports 2018. 11: 1365–1377) и уровни указывают в соответствии со следующей цветовой схемой в таблице 10.

15

20

**Таблица 10. Цветовые схемы обозначения опасных веществ**

Зеленый	Нет обеспокоенности
Желтый	Низкая обеспокоенность
Красный	Высокая обеспокоенность
Черный	Очень высокая обеспокоенность из-за событий аритмии

Ранжирование тестируемого соединения по степени опасности для анализа  $Ca^{2+}$ -транзиента, измеренного в HiPSc-CM, как указано выше, разными цветами и в соответствующей таблице.

25

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Использование iCell® Cardiomyocytes2 в качестве линии клеток*

Положительные и отрицательные контроли: В этом анализе у всех положительных и отрицательных контролей отмечались ожидаемые фармакологические эффекты.

5 Полученные результаты показаны в таблицах 11 и 12.

**Таблица 11. Оценка опасности соединения А3**

Соединение	Цвет при 0,1 мкМ	Цвет при 0,2 мкМ	Цвет при 0,5 мкМ	Цвет при 1 мкМ	Цвет при 2,5 мкМ	Цвет при 5 мкМ
А3	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Зеленый

**Таблица 12. Оценка опасности соединения А1**

Соединение	Цвет при 0,1 мкМ	Цвет при 0,3 мкМ	Цвет при 1 мкМ	Цвет при 3 мкМ	Цвет при 10 мкМ	Цвет при 30 мкМ
А1	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Зеленый	желтый

10 Для соединения А1: при эффективной дозе 30 мнк (мг/кг) в моделях мышинных ксенотрансплантатов концентрация СТСМ человека в сравнении с  $C_{\max}$  в свободном состоянии будет оцениваться следующим образом:

Предельный СТСМ человека 10 мкМ против свободного  $C_{\max} > 16$  (мышь, человек)

Предельный СТСМ человека 30 мкМ против свободного  $C_{\max} > 45$  (мышь, человек).

15 8) *Влияние на мембранный калиевый ток  $I_{Kr}$  в клеточных линиях, трансфицированных hERG*

Протокол 1:

## Сокращения

CHO	Линия клеток яичника китайского хомяка
DMSO	Диметилсульфоксид
hERG	Ген специфических калиевых каналов сердца человека
$I_{Kr}$	быстро активирующий калиевый ток замедленного выпрямления

### Способы

Эксперименты выполняли с использованием клеток CHO, стабильно экспрессирующих калиевый канал hERG. Клетки выращивали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в культуральных колбах в среде Хэма F12, дополненной 10% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой, гиртомицином В (100 мкг/мл) и генетицином (100 мкг/мл). Для использования в автоматизированной системе пэтч-клампинга QPatch (Sophion) клетки собирали для получения клеточной суспензии одиночных клеток.

Растворы: раствор ванны содержал (в mM) 145 NaCl, 4 KCl, 10 глюкозу, 10 HEPES ((4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинетансульфоная кислота), 2 CaCl<sub>2</sub> и 1 MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4 с NaOH). Раствор в пипетках содержал (в mM) 120 KCl, 10 EGTA (этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота), 10 HEPES, 5,374 CaCl<sub>2</sub> и 1,75 MgCl<sub>2</sub> (pH 7,2 с KOH).

Эксперименты пэтч-кламп проводили в режиме вольт-кламп и токи в целых клетках регистрировали с помощью автоматизированного анализатора пэтч-кламп с использованием системы QPatch (Sophion). Токовые сигналы усиливались и оцифровывались, сохранялись и анализировались с помощью программного обеспечения QPatch assay.

Исходный потенциал составлял -80 мВ. Ток hERG (K<sup>+</sup>-селективный выходящий ток) определяли как максимальный следовой ток при -40 мВ после 2-секундной деполяризации до +60 мВ. Частота циклирования импульсов составляла 15 с. Короткий импульс (90 мс) до -40 мВ служил базовым шагом для расчета амплитуды хвостового тока. После установления конфигурации целых клеток и периода стабильности на 5 минут наносили контрольный растворитель (0,3% DMSO), а затем исследуемое вещество в четырех возрастающих концентрациях  $3 \times 10^{-7}$  М,  $3 \times 10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М и  $3 \times 10^{-5}$  М. Каждую концентрацию исследуемого вещества наносили дважды. Действие каждой концентрации определяли через 5 мин как средний ток трех последовательных импульсов напряжения. Для определения степени блокировки остаточный ток сравнивали с предварительной обработкой носителем.

Зависимости концентрация/ответ рассчитывали путем нелинейного подбора по методу наименьших квадратов для отдельных точек данных. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) рассчитывали по методике подбора.

Каждое соединение реплицировали на одном и том же планшете в по меньшей мере 5 лунках. Процент ингибирования по результатам приводится ниже таблице 13.

**Таблица 13. hERG IC<sub>50</sub> (мкМ) из протокола 1**

Номер соединения	hERG-IC <sub>50</sub> (мкМ)
А	> 30,2

9) *Исследование эффективности в модели диссеминированных ОСI-AML3*

*Исследуемые агенты и контроли*

5 Соединение А3 готовили в 20% гидроксипропил-бета-циклодекстрине (HP-β-CD) и получали в общем объеме, достигающем 0,2 мл (10 мл/кг) на дозу для животного массой 20 г. Дозы корректировали по индивидуальной массе тела каждый день. Рабочие исходные растворы соединения А3 готовили один раз в неделю для каждого исследования и хранили при температуре 25 °С.

10 *Животные*

Использовали самок мышей SCID с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров (CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-J/Crl/-) в возрасте приблизительно 6–8 недель и с весом приблизительно 25 г. Всем животным давали возможность акклиматизироваться и восстановиться после стресса, связанного с транспортировкой, в течение по меньшей мере 7 дней перед использованием в эксперименте. В свободном доступе предоставляли автоклавированную воду и обработанный облучением корм и животных содержали в 12-часовом цикле свет/темнота. Клетки, подстилку и бутылки для воды автоклавировали перед применением и меняли еженедельно. Культура тканей и реагенты для инъекций клеток представлены ниже в таблице 14.

20 **Таблица 14. Культура тканей и реагенты для инъекций клеток**

DPBS (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко)
Теплоинактивированная фетальная бычья сыворотка
Среда MEM альфа
L-глутамин
Гентамицин
Колба для культивирования T175
Роллерный флакон

### *Модель опухоли и способ культивирования клеток*

Клетки AML клеточной линии OCI-AML3 человека культивировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в указанной полной культуральной среде (MEM Alpha + 20% HI-FBS (теплоинактивированная фетальная бычья сыворотка) + 2 мМ L-глутамин + 50 мкг/мл гентамицина). Клетки собирали при логарифмическом росте и ресуспендировали в холодной (4 °С) бессывороточной среде MEM (минимальная питательная среда) Alpha. В модели диссеминированных OCI-AML3 каждая мышь получала  $5 \times 10^5$  клеток посредством в/в инъекции в общем объеме 0,2 мл с помощью иглы 26-го калибра.

### 10 *Дизайн исследования*

Соединение А3 вводили перорально (п/о) ежедневно.

День 0 представляет собой день имплантации опухолевых клеток и начала исследования.

В исследовании эффективности мышей, несущих ксенотрансплантаты опухоли IV OCI-AML3, случайным образом распределяли по экспериментальным группам через 3 дня после приживления опухолевых клеток. Лечение носителем или соединением А3 (при 30, 50, 100 мг/кг) начинали в тот же день с ежедневным введением дозы в течение 28 дней.

### 20 *Наблюдение за животными*

Осуществляли ежедневный контроль животных на предмет клинических признаков, связанных с токсичностью соединения или опухолевой нагрузкой (т. е. паралич задних конечностей, летаргия и т. д.).

### 25 *Расчеты*

Для оценки выживаемости результаты рассчитывали как процентное отношение выживаемости к количеству дней после имплантации опухоли. В качестве суррогатной конечной точки для смерти использовали отрицательные клинические признаки и/или потерю массы тела на  $\geq 20\%$ . Медианную выживаемость определяли с помощью анализа выживаемости Каплана — Мейера. Процент увеличения продолжительности жизни (ILS) рассчитывали следующим образом: ((медиана дня выживания в группе лечения - медиана дня выживания в контрольной группе) / медиана дня выживания в

контрольной группе)  $\times 100$ . Животных, не достигших суррогатной конечной точки из-за неблагоприятных клинических проявлений (таких как изъязвленные опухоли, потеря массы тела и т. д.) или смерти, не связанной с лечением, цензурировали для оценки выживаемости. В соответствии с критериями NCI ILS  $\geq 25\%$  считается биологически значимым. (Johnson JJ et al. Br J Cancer. 2001. 84(10), 1424-1431).

### *Анализ данных*

Данные о выживаемости и массе тела представляли графически с помощью программы Prism (версия 7). Статистическую значимость для массы тела оценивали, как описано выше. Статистическую значимость графиков выживаемости Каплана — Мейера при сравнении экспериментальной терапевтической группы с соответствующей группой, получавшей контрольный носитель, оценивали с помощью логарифмического рангового критерия (критерия Кокса — Мантеля) в программе R версии 3.4.2. Различия между группами считались значимыми, когда значение  $p$  составляло  $\leq 0,05$ .

### *Выживаемость*

Кривая выживаемости Каплана — Мейера показана на **Фиг. 3**. Мышам, несущим установленные опухоли OCI-AML3, ежедневно перорально вводили соединение А3 в дозе 30, 50, 100 мг/кг в 20%-ом HP- $\beta$ -CD составе в течение 28 дней ( $n = 9-10$ /группа). В группах, получавших соединение А3, медиана выживаемости была достигнута в следующие дни: для 30 мг/кг на 75,5 день, для 50 мг/кг на 58,5 день и для 100 мг/кг на 75 день по сравнению с медианой выживаемости 38,5 дней для контрольной группы, получавшей носитель. Лечение соединением А3 привело к статистически значимому увеличению продолжительности жизни мышей, несущих опухоль OCI-AML3, на 96,1%, 51,9% и 94,8% (на уровнях доз 30, 50 и 100 мг/кг) по сравнению с мышами из контрольной группы ( $p \leq 0,001$ ). Это было биологически значимое значение ILS в соответствии с порогом критериев NCI, составляющим ILS  $\geq 25\%$  (Johnson JJ et al. Br J Cancer. 2001. 84(10), 1424-1431).

### Данные по стабильности

Выполняли эксперименты по стабильности для кристаллической формы А гидрата бис-безилатной соли (R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-

триазин-6-ил)окси)бензамида. Гидрат бис-безилатной соли оказался химически и физически стабильным в оцениваемых стрессовых условиях с отсутствием разложения по данным УВЭЖХ и отсутствием изменений в твердом веществе по данным XRD.

	Чистота безилатной соли	XRD
Базовое значение	99,65	—
50 °С / 10% отн. влажн., 7 дней	99,64	—
50 °С / 10% отн. влажн., 14 дней	99,62	—
50 °С / 50% отн. влажн., 7 дней	99,65	—
50 °С / 50% отн. влажн., 14 дней	99,66	—
Базовое значение	99,21	Кристаллическая, форма А, стандарт
50 °С / 30% отн. влажн., 21 день	99,32	Соответствие стандарту
50 °С / 75% отн. влажн., 21 день	99,36	Соответствие стандарту

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Безилатная соль (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-  
5 триазин-6-ил)окси)бензамида



или ее сольват.

2. Соединение по п. 1, причем сольват представляет собой гидрат.
- 10 3. Соединение по п. 1, представляющее собой кристаллическую форму А гидрата бис-безилатной соли (*R*)-*N*-этил-5-фтор-*N*-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-  
15 триазин-6-ил)окси)бензамида, причем кристаллическая форма дает порошковую рентгеновскую дифрактограмму, содержащую пики при 5,4, 7,2, 11,1, 11,9 и 21,7 градуса два тета  $\pm$  0,2 градуса два тета.
4. Кристаллическая форма по п. 3, причем рентгеновская порошковая дифрактограмма может дополнительно содержать по меньшей мере один пик,  
20 выбранный из 13,7, 14,5, 14,7, 15,0, 16,5, 17,8, 19,0, 19,4 и 20,1 градуса два тета  $\pm$  0,2 градуса два тета.
5. Кристаллическая форма по п. 3 или п. 4, дополнительно характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, по существу как показано на Фиг. 1.
- 25 6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из предшествующих пунктов и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого

носителя, фармацевтически приемлемого эксципиента и фармацевтически приемлемого разбавителя.

7. Способ получения фармацевтической композиции по п. 6, включающий смешивание фармацевтически приемлемого носителя с терапевтически эффективным количеством соединения по любому из пп. 1–5.

8. Соединение по любому из пп. 1–5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения в качестве лекарственного средства.

9. Соединение по любому из пп. 1–5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения в профилактике или лечении рака.

10. Соединение по любому из пп. 1–5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения в профилактике или лечении лейкоза, миелодиспластического синдрома (MDS) и миелопролиферативных новообразований (MPN).

11. Соединение или фармацевтическая композиция для применения по п. 10 в профилактике или лечении лейкоза, причем лейкоз представляет собой (NPM1)-мутированный лейкоз.

12. Соединение или фармацевтическая композиция для применения по п. 9, причем рак выбран из лейкозов, лимфом, миелом или форм рака в виде солидной опухоли, таких как рак предстательной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак печени, меланома и глиобластома.

13. Соединение или фармацевтическая композиция для применения по п. 10 в профилактике или лечении лейкоза, причем лейкоз выбран из острых лейкозов, хронических лейкозов, миелоидных лейкозов, миелогенных лейкозов, лимфобластных лейкозов, лимфоцитарных лейкозов, острых миелогенных лейкозов (AML), хронических миелогенных лейкозов (CML), острых лимфобластных лейкозов (ALL), хронических лимфоцитарных лейкозов (CLL), Т-клеточных пролимфоцитарных лейкозов (Т-PLL), лейкоза из больших гранулярных лейкоцитов, волосатоклеточного лейкоза (HCL), лейкозов с перестройкой MLL, MLL-PTD лейкозов, MLL-

амплифицированных лейкозов, MLL-позитивных лейкозов и лейкозов, проявляющих повышенные сигнатуры экспрессии гена *HOX/MEIS1*.

14. Способ лечения или профилактики расстройства, выбранного из рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1–5 или фармацевтической композиции по п. 6.

15. Способ получения кристаллической формы по любому из пп. 3–5, включающий стадию перекристаллизации соединения А, причем перекристаллизация включает стадии:

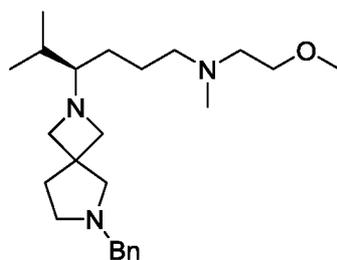
- a) добавления соединения А, или его гидрата, или сольвата к смеси подходящих растворителей в присутствии бензолсульфоновой кислоты и изменения температуры в диапазоне от около 20 °С до температуры кипения растворителя с обратным холодильником;
- b) затравки кристаллической формой А;
- c) образования осадка кристаллической формы по любому из пп. 3–5.

16. Способ по п. 15, в котором смесь приемлемых растворителей представляет собой смесь ацетона, воды и IPAc.

17. Способ по п. 15, в котором смесь приемлемых растворителей представляет собой смесь изопропанола, воды и IPAc.

18. Способ по п. 15, п. 16 или п. 17, в котором температура составляет около 25 °С.

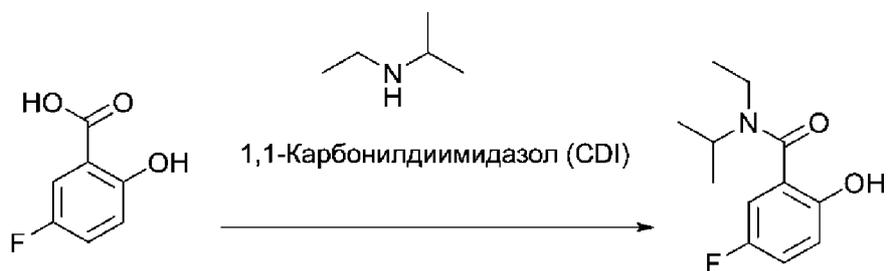
19. Кристаллическая форма

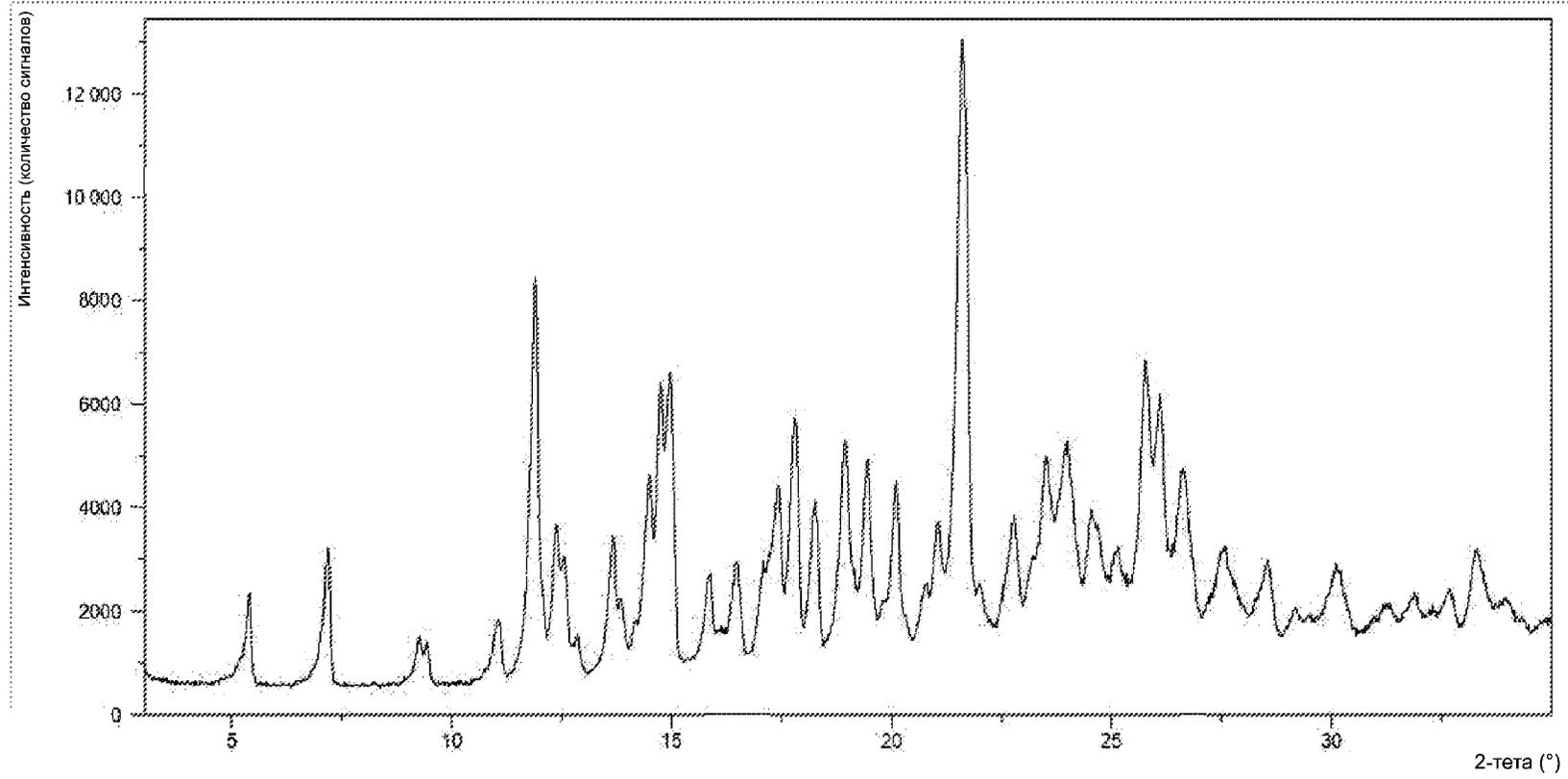


соли лимонной кислоты

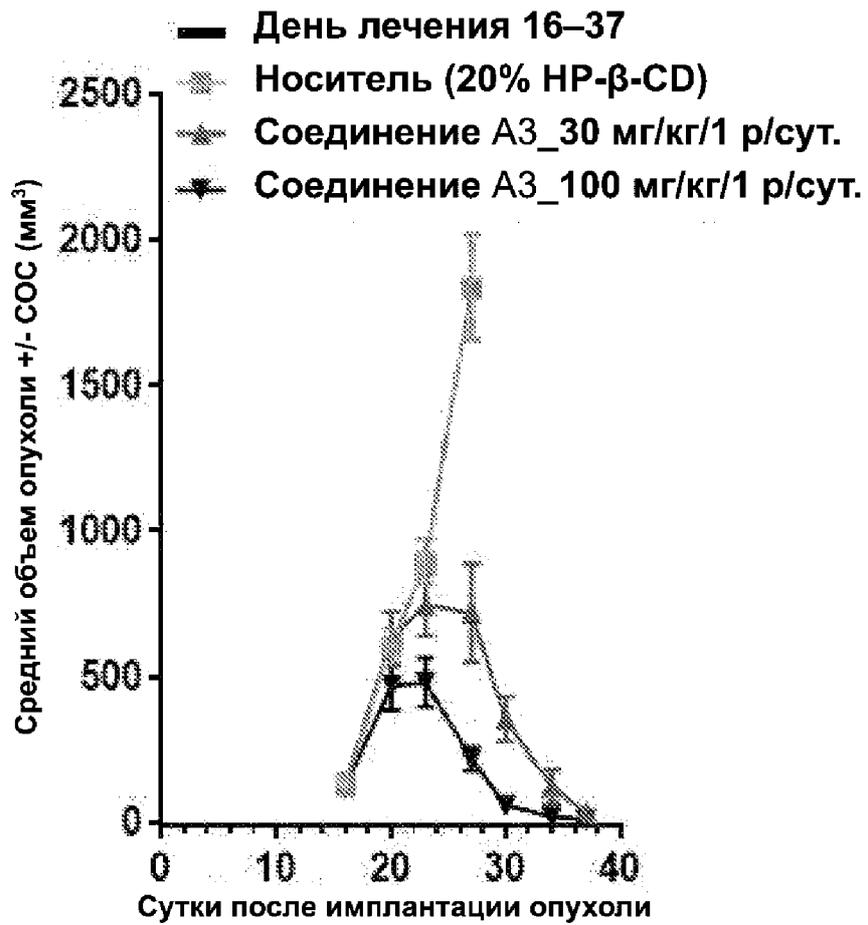
,  
 причем кристаллическая форма дает порошковую рентгеновскую дифрактограмму, содержащую пики при 5,82, 10,09 и 18,42 градуса два тета  $\pm$  0,2 градуса два тета.

20. Способ получения N-этил-5-фтор-2-гидрокси-N-изопропилбензамида посредством одностадийной реакции 5-фтор-2-гидроксибензойной кислоты в присутствии связывающего агента CDI в подходящем растворителе:

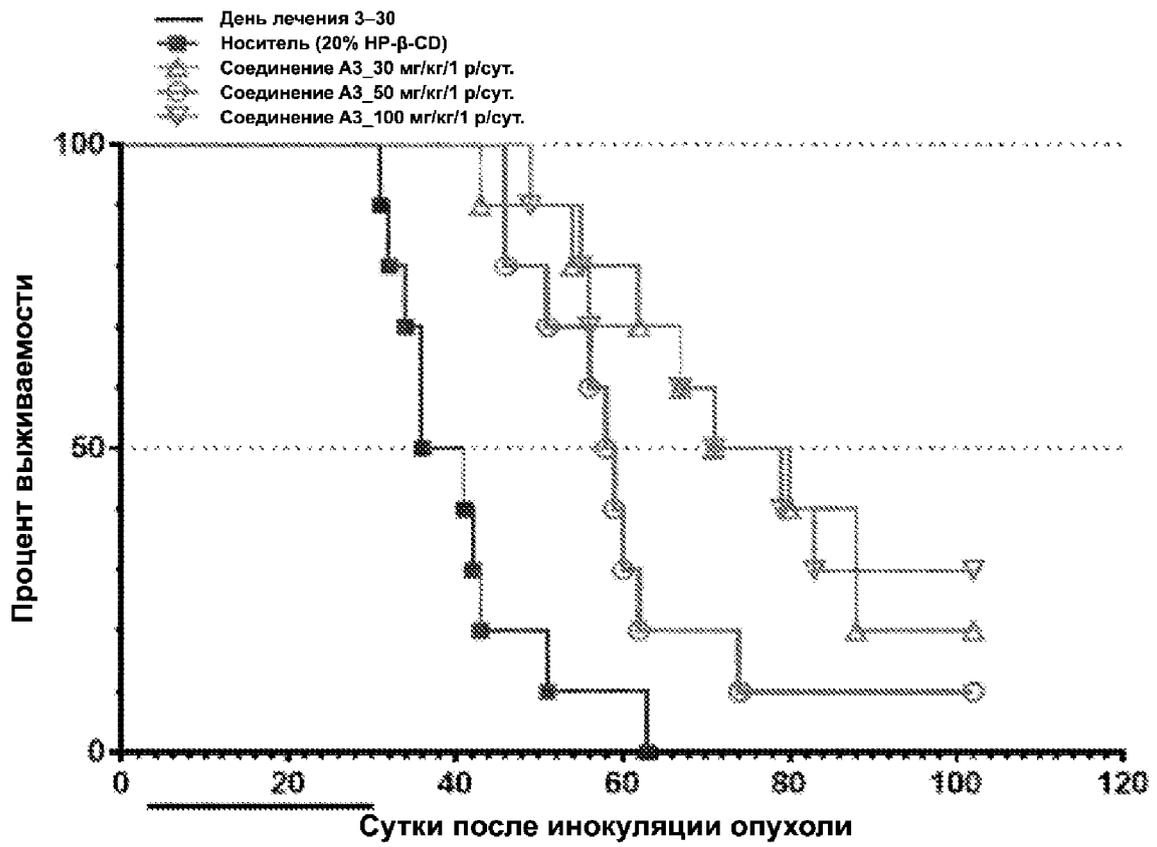




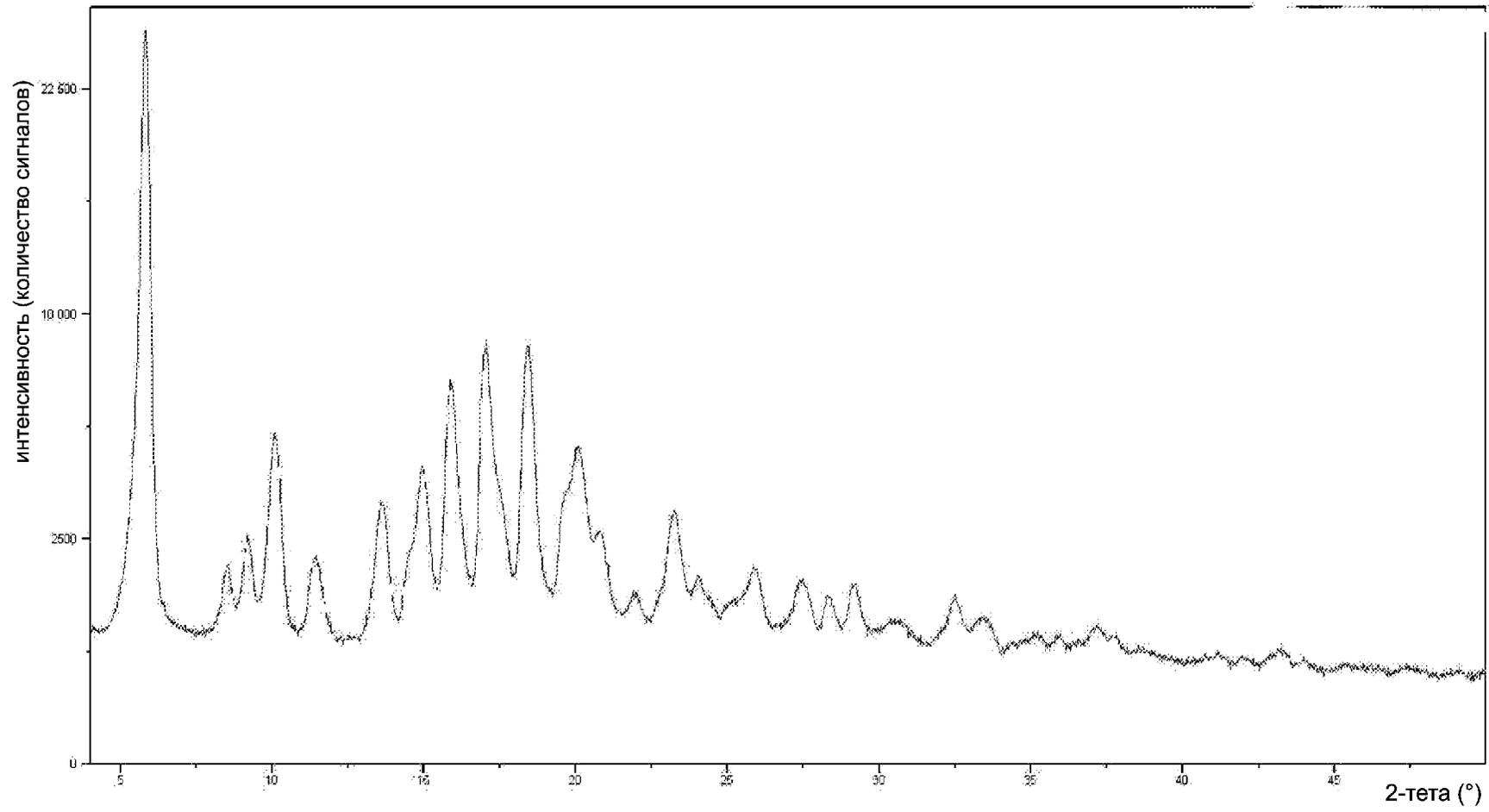
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4