

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201792676 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.07.28

(51) Int. Cl. *C07D 403/12* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ JAK1

(31) 62/200,684

(32) 2015.08.04

(33) US

(86) PCT/US2016/044410

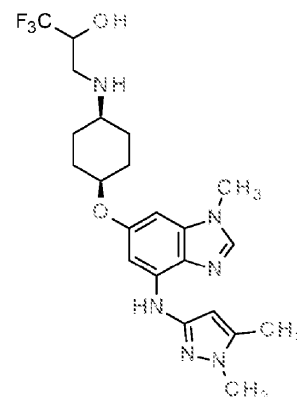
(87) WO 2017/023672 2017.02.09

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

(72) Изобретатель:
Клейтон Джошуа Райан (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к некоторым бензимидазольным соединениям или их фармацевтически приемлемым солям, которые ингибируют Янус-киназу 1 (JAK1), к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, и к способам применения указанных соединений для лечения некоторых типов рака.



201792676 A1

201792676 A1

ИНГИБИТОРЫ JAK1

Настоящее изобретение относится к некоторым бензимидазольным соединениям или их фармацевтически приемлемым солям, которые ингибируют Янус-киназу 1 (JAK1), к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, и к способам применения указанных соединений для лечения некоторых типов рака.

Киназы JAK представляют собой семейство тирозинкиназ, которые регулируют фосфорилирование тирозина различных эффекторов и инициируют активацию нисходящих сигнальных путей. JAK1 является членом указанного семейства, который опосредует активацию сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3, STAT3. Постоянная активация STAT3 вызывает образование опухолей и промотирует выживание и пролиферацию раковых клеток. Было показано, что aberrации в активации STAT3 разрушают иммунный надзор опухоли в микроокружении опухоли. Следовательно, ингибирование JAK1 может блокировать активацию STAT3, что приводит к подавлению роста опухоли и иммунного надзора опухоли. Кроме того, активация мутаций JAK1 идентифицирована при остром лимфобластном лейкозе клеток Т-линии и при гепатоцеллюлярной карциноме жителей Азии, и была показана ее онкогенность. Полученные результаты позволяют предположить, что JAK1 является возможной онкологической мишенью.

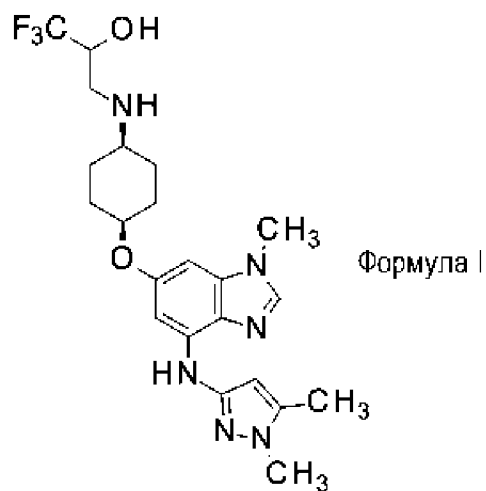
Известно, что JAK2 образует гомодимеры, которые опосредуют передачу сигналов на пути от рецепторов EPO и TPO к STAT5, который регулирует выработку красных кровяных клеток и тромбоцитов. Ингибирование JAK2 может приводить к анемии и тромбоцитопении. Однако JAK1 не проявляет подобной активности и, следовательно, можно предположить, что соединения, которые селективно ингибируют JAK1, могут обладать улучшенным профилем гематотоксичности и/или иммуногенности, чем соединения, которые селективно ингибируют JAK2, или двойные ингибиторы JAK1/2.

Соединения-ингибиторы киназ JAK описаны в литературных источниках. Например, в US 2015/0203455 описаны некоторые бензимидазольные соединения, которые являются ингибиторами JAK.

Сохраняется потребность в обеспечении альтернативных ингибиторов JAK1 для лечения рака. Кроме того, сохраняется потребность в обеспечении селективных ингибиторов JAK1, которые уменьшают или не допускают ингибирование JAK2. Соответственно, в настоящем изобретении предложены некоторые ингибиторы JAK1, которые могут быть применимы для лечения рака. Кроме того, в настоящем изобретении

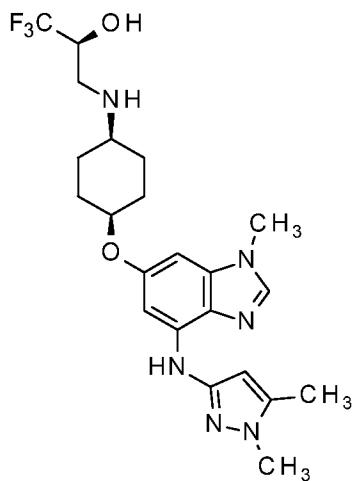
предложены некоторые селективные ингибиторы JAK1, которые могут снижать ингибирование JAK2.

В настоящем изобретении предложено соединение Формулы I:



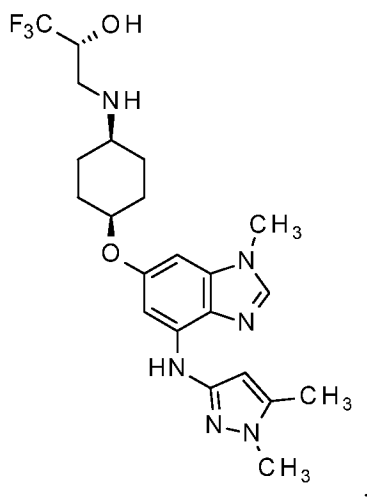
или его фармацевтически приемлемая соль.

Предпочтительно, в настоящем изобретении предложено соединение, выбранное из группы, состоящей из (2S)-3-{{цис-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил}амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола:



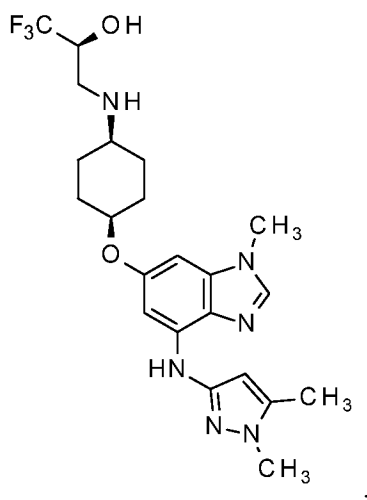
или его фармацевтически приемлемой соли, и

(2R)-3-{{цис-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил}амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола:

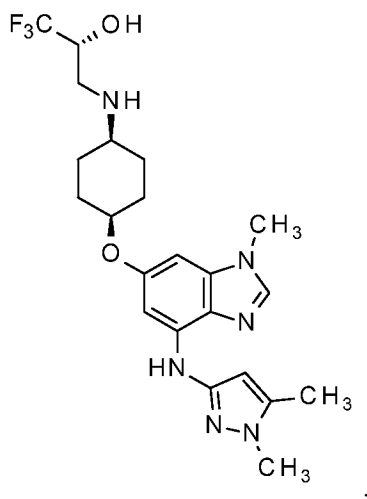


или его фармацевтически приемлемой соли.

Предпочтительно, в настоящем изобретении предложено соединение, представляющее собой (2S)-3-{{[*cis*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол:



или его фармацевтически приемлемая соль. Более предпочтительно, в настоящем изобретении предложено соединение, представляющее собой (2R)-3-{{[*cis*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол:



или его фармацевтически приемлемая соль.

В качестве конкретного варианта реализации, в настоящем изобретении предложено соединение, представляющее собой (2R)-3-{{*cyc*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол.

В качестве конкретного варианта реализации, в настоящем изобретении предложено также соединение, представляющее собой (2S)-3-{{*cyc*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (2R)-3-{{*cyc*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (2R)-3-{{*cyc*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (2R)-3-{{*cyc*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола или его фармацевтически приемлемой соли. В настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (2R)-3-{{*cyc*-4-({4-

[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола.

В настоящем изобретении предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В настоящем изобретении предложен (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В настоящем изобретении предложен (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении рака.

В настоящем изобретении предложено соединение Формулы I для применения в терапии. В настоящем изобретении также предложен (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол для применения в терапии. В настоящем изобретении предложен (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол для применения при лечении рака.

В настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения рака. В настоящем изобретении предложено применение (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения рака. В настоящем изобретении также предложено применение (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола в производстве лекарственного средства для лечения рака.

В настоящем изобретении предложено свободное основание (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола в кристаллической форме. В настоящем изобретении также предложено свободное основание (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола в кристаллической форме, характеризующееся диаграммой рентгеновской порошковой дифракции, имеющей характеристические пики, выраженные в градусах $2\theta \pm 0,2$, при $19,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $11,9^\circ$, $15,4^\circ$ и $17,6^\circ$.

В настоящем изобретении предложена соль (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола с диметансульфоновой кислотой в кристаллической форме. В настоящем изобретении также предложена соль (2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ола с диметансульфоновой кислотой в кристаллической форме, характеризующаяся диаграммой рентгеновской порошковой дифракции, имеющей характеристические пики, выраженные в градусах $2\theta \pm 0,2^\circ$, при $21,7^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $21,2^\circ$, $18,0^\circ$ и $15,7^\circ$.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены предпочтительные варианты реализации способов и применений, описанных в настоящем документе, в которых рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого и аденокарциному легкого, аденокарциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, включая гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии, колоректального рака, рака молочной железы, лимфомы и лейкоза, включая острый лимфоцитарный лейкоз и острый лимфобластный лейкоз клеток Т-линии. Предпочтительные виды рака представляют собой рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого и аденокарциному легкого, аденокарциному, гепатоцеллюлярную карциному, включая гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии, колоректальный рак, рак молочной железы и лейкоз, включая острый лимфоцитарный лейкоз. Более предпочтительные виды рака представляют собой немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, рак молочной железы и гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии.

Следует понимать, что следующие термины, упомянутые выше и по всему тексту настоящего изобретения, если не указано иное, имеют следующие значения:

«Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» представляет собой среду, общепринятую в данной области техники для доставки биологически активных агентов млекопитающим, например, людям.

«Фармацевтически приемлемые соли» или «фармацевтически приемлемая соль» относится к относительно нетоксичной неорганической и органической соли или солям соединения согласно настоящему изобретению.

«Эффективное количество» означает количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение или его фармацевтически приемлемую соль согласно настоящему изобретению, которое вызывает биологический или медицинский ответ или требуемый терапевтический эффект в ткани, системе,

организме животного, млекопитающего или человека, наблюдаемый исследователем, ветеринаром, врачом или иным клиницистом.

Термины «лечение», «лечить», «лечащий» и т.п. включают замедление или реверсирование развития расстройства. Указанные термины включают также облегчение, улучшение, снижение, исключение или ослабление одного или более симптомов расстройства или патологического состояния, даже если указанное расстройство или патологическое состояние фактически не устранено и даже если прогрессирование расстройства или патологического состояния само по себе не замедлено или не реверсировано.

Соединение согласно настоящему изобретению может вступать в реакцию, например, с многочисленными неорганическими и органическими кислотами с образованием фармацевтически приемлемых солей. Такие фармацевтически приемлемые соли и общие методики их получения известны в данной области техники. См., например, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, том 66, № 1, январь 1977.

Соединение согласно настоящему изобретению предпочтительно составляют в виде фармацевтической композиции, используя фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, и вводят различными способами. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, *et al.*, ред., 21-ое изд., Mack Publishing Co., 2005).

Фактически вводимое количество соединения согласно настоящему изобретению определяет врач с учетом релевантных обстоятельств, включая патологическое состояние, подлежащее лечению, выбранный способ введения, фактическое вводимое соединение согласно настоящему изобретению, возраст, массу тела и реакцию индивидуального пациента, а также тяжесть симптомов пациента. Суточные дозы обычно входят в диапазон от около 50 до 1000 мг в сутки, предпочтительно от 80 до 600 мг в сутки, наиболее предпочтительно 300 мг в сутки. В некоторых случаях могут быть более подходящими уровни доз, которые меньше нижнего предела вышеуказанного диапазона, а в других случаях могут быть использованы более высокие дозы. Уровни доз могут быть определены специалистом в данной области техники.

Соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль могут быть получены посредством многочисленных способов, известных

в данной области техники, а также способов, описанных ниже в разделе «Способы получения и примеры». Конкретные стадии синтеза каждого из описанных способов могут быть различным образом комбинированы с получением соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

Реагенты и исходные материалы обычно легкодоступны для специалистов в данной области техники. Другие реактивы могут быть получены по стандартным методикам органической и гетероциклической химии, методикам, известным специалистам в данной области техники, и способам, описанным ниже в разделе «Примеры», включая все новые способы. Настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано далее в разделе «Способы получения и примеры». Если не указано иное, то названия и нумерация соединений, представленных в настоящем документе, были получены с помощью IUPACNAME ACDLABS.

Отдельные изомеры, энантиомеры или диастереомеры могут быть выделены или разделены специалистами в данной области техники в любой удобной точке синтеза соединений при помощи таких способов, как технология селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions* (J. Jacques, *et al.*, John Wiley and Sons, Inc., 1981)).

Специалистам в данной области техники понятно, что соединение согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один хиральный центр. Настоящее изобретение включает все отдельные энантиомеры или диастереомеры, а также смеси энантиомеров и диастереомеров указанных соединений, включая рацематы. Предпочтительно, что соединение согласно настоящему изобретению существует в виде одного энантиомера или диастереомера. Отдельный энантиомер или диастереомер может быть получен, исходя из хиральных реагентов или технологиями стереоселективного или стереоспецифического синтеза. Альтернативно, отдельный энантиомер или диастереомер может быть выделен из смесей стандартными технологиями хиральной хроматографии или кристаллизации.

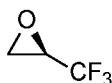
Соединение согласно настоящему изобретению может быть получено в соответствии со способами синтеза, хорошо известными и принятыми в данной области техники. Подходящие условия реакций для стадий указанных реакций хорошо известны в данной области техники, и подходящие замены растворителей и совместных реагентов известны специалистам в данной области техники. Таким же образом, специалистам в данной области техники понятно, что синтетические промежуточные соединения, при необходимости или желании, могут быть выделены и/или очищены различными общеизвестными технологиями, и что зачастую можно использовать различные

промежуточные соединения непосредственно на следующих стадиях синтеза с незначительной очисткой или без очистки. Кроме того, опытным специалистам понятно, что в некоторых случаях порядок введения фрагментов не критичен. Конкретный порядок стадий, необходимых для получения соединения согласно настоящему изобретению, зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной подвижности замещенных фрагментов, что понятно опытным химикам. Все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее, и все реагенты являются общеизвестными и принятыми в данной области техники.

В данном контексте следующие термины имеют указанные значения: «АТФ» относится к аденозин-5'-трифосфату; «BSA» относится к альбумину бычьей сыворотки; «ДМСО» относится к диметилсульфоксиду; «ЭДТК» относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; «ЭГТК» относится к этиленгликольтетрауксусной кислоте; «FBS» относится к эмбриональной бычьей сыворотке; «GFP» относится к зеленому флуоресцентному белку; «HEPES» относится к 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоте; «HWB» относится к цельной крови человека; «IC₅₀» относится к концентрации соединения, которая снижает данный ответ (связывание лиганда или ответ фермента) на 50%; «относительная IC₅₀» относится к относительной концентрации, обеспечивающей половину от максимального ответа на соединение; «IVTI» относится к ингибированию мишени *in vivo*; «JAK» относится к Янус-киназе; «МС» относится к масс-спектропии; «ЯМР» относится к ядерному магнитному резонансу; «NSCLC» относится к немелкоклеточному раку легкого; «PBS» относится к фосфатно-солевому буферному раствору; «РНКаза» относится к рибонуклеазе; «комн. т-ра» относится к комнатной температуре; «SCLC» относится к мелкоклеточному раку легкого; «STAT» относится к сигнальным трансдукторам и активаторам транскрипции; «TED» относится к пороговой эффективной дозе; «TR-FRET» относится к резонансному переносу энергии флуоресценции с временным разрешением.

Подготовительный синтез 1

(2R)-2-(Трифторметил)оксиран

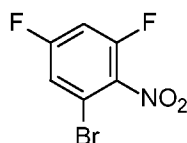


Добавляли уксусную кислоту (0,89 мл, 0,052 экв.) к раствору (1S,2S)-(+)-1,2-циклогександиамино-N,N'-бис(3,5-ди-трет-бутилсалицилиден)кобальта (II) (0,90 г, 0,0050 экв.) в толуоле (16,65 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Растворитель удаляли *in vacuo*. Добавляли толуол (20 мл) и концентрировали *in vacuo*. Охлаждали до 0 °С и добавляли 2-(трифторметил)оксиран (37,00 г, 330 ммоль; э.и. 80,0%, (2R) является основным энантиомером). Перемешивали в течение пяти минут и по каплям добавляли воду (0,80 мл, 0,15 экв.). Оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Перегоняли под вакуумом при комнатной температуре, собирая указанное в заголовке соединение в охлажденную колбу в виде светло-желтого маслянистого вещества (28,10 г, 76%; э.и. 99,8%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2,92-2,94 (м, 1H), 2,98-3,01 (м, 1H), 3,41-3,46 (м, 1H).

Смешивали указанное в заголовке соединение (0,13 г, 1,16 ммоль) и метанол (1,3 мл). Охлаждали до 0 °С и добавляли триэтиламин (0,17 мл, 1,10 экв.) и тиофенол (0,12 мл, 1,05 экв.). Перемешивали в течение 30 минут. ГХ-МС алиquotы показал образование 1,1,1-трифтор-3-фенилсульфанилпропан-2-ола (в результате раскрытия кольца указанного в заголовке соединения); *m/z* = 222. Хиральная ЖХ-МС показала э.и. 99,8%, (2S)-1,1,1-трифтор-3-фенилсульфанилпропан-2-ол является основным энантиомером.

Подготовительный синтез 2

1-Бром-3,5-дифтор-2-нитробензол

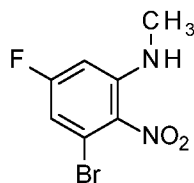


По каплям добавляли азотную кислоту (дымящую, 20 мл) к раствору 1-бром-3,5-дифторбензола (35,00 мл, 304 ммоль) в серной кислоте (50 мл) при 0 °С. Оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Выливали реакционную смесь в смесь льда и воды (600 мл). Оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры. Добавляли этилацетат (200 мл) и гексаны (100 мл). Перемешивали до полного растворения твердого вещества. Разделяли слои. Промывали органический слой насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над

безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого маслянистого вещества (57,37 г, 79%). ГХ-МС $m/z = 237,239$ (Br).

Подготовительный синтез 3

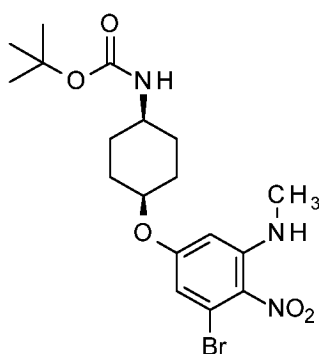
3-Бром-5-фтор-N-метил-2-нитроанилин



Добавляли 2 М раствор монометиламина в тетрагидрофуране (92 мл, 2,00 экв.) к раствору 1-бром-3,5-дифтор-2-нитробензола (21,90 г, 92 ммоль) в 1,4-диоксане (92 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 45 минут. Добавляли воду и экстрагировали этилацетатом. Промывали органический слой насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 20-40% метиленхлорида в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества (16,95 г, 74%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 249/251 (M+H).

Подготовительный синтез 4

трет-Бутил-{*цис*-4-[3-бром-5-(метиламино)-4-нитрофенокси]циклогексил}карбамат

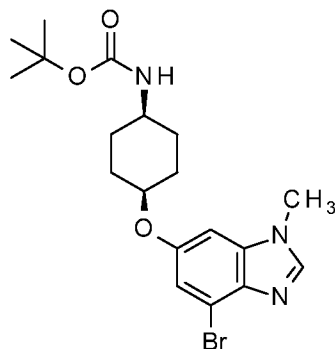


Смешивали 3-бром-5-фтор-N-метил-2-нитроанилин (75,04 г, 301 ммоль), *трет*-бутил-(*цис*-4-гидроксициклогексил)карбамат (89,52 г, 1,38 экв.) и тетра(н-бутил)аммония бисульфат (15,58 г, 0,15 экв.) в дихлорметане (975 мл) и 5 М водном растворе гидроксида натрия (241 мл). Быстро перемешивали при 37 °С в атмосфере азота в течение пяти дней. Охлаждали до комнатной температуры. Разбавляли дихлорметаном (200 мл) и водой (400 мл). Разделяли слои. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3 x 100 мл). Промывали

объединенные органические слои насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 0-40% этилацетата в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества (68,57 г, 51%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 442/444 (M-H).

Подготовительный синтез 5

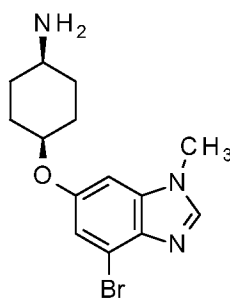
трет-Бутил-{*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}карбамат



Смешивали *трет*-бутил-{*цис*-4-[3-бром-5-(метиламино)-4-нитрофенокси]циклогексил}карбамат (76,92 г, 173 ммоль) и 5% платину на углеводе (сульфидированный, 3,85 г) в тетрагидрофуране (923 мл) в реакторе Парра. Перемешивали при комнатной температуре при давлении водорода 414 кПа в течение трех дней. Фильтровали через диатомовую землю. Промывали тетрагидрофураном. К объединенным тетрагидрофурановым фильтратам добавляли триметилортоформиат (165 мл, 8,70 экв.). Перемешивали в течение 22 часов при 63 °С. Концентрировали основную часть реакционной смеси *in vacuo*. Разбавляли водой (400 мл) и этилацетатом (400 мл). Подщелачивали водным раствором карбоната натрия до pH 9. Разделяли слои. Водный слой экстрагировали этилацетатом (2 x 200 мл). Сушили объединенные органические слои над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Разбавляли метил-*трет*-бутиловым эфиром (400 мл) и обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. Фильтровали, промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром и сушили под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (52,02 г, 71%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 424/426 (M+H).

Подготовительный синтез 6

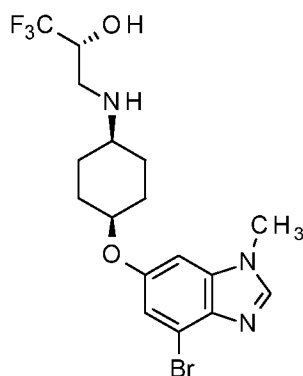
цис-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанами́н



Через капельную воронку медленно добавляли трифторуксусную кислоту (666 мл) к раствору *трет*-бутил-{{*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}карбамата (222 г, 497 ммоль) в дихлорметане (1110 мл) при 0 °С. Оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь *in vacuo*. Добавляли воду (250 мл) и подщелачивали 50% водным раствором гидроксида натрия до pH 10. Добавляли воду (250 мл). Экстрагировали 20% раствором метанола в дихлорметане (1500 мл, затем 500 мл, затем 250 мл). Промывали объединенные органические слои 2 М водным раствором гидроксида натрия, сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде коричневого твердого вещества (155 г, 91%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 324/326 (M+H).

Подготовительный синтез 7

(2R)-3-({*цис*-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол

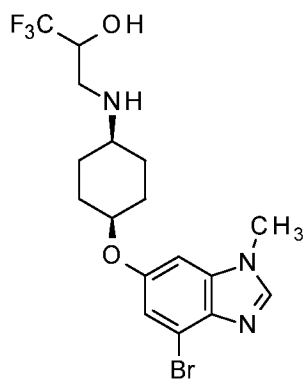


Добавляли (2R)-2-(трифторметил)оксиран (73,29 г, 1,50 экв.) к раствору *цис*-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанамина (150,4 г, 436 ммоль) в метаноле (1053 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 0-10% этанола в дихлорметане, с получением

указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (98,10 г, 52%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 436/438 (M+H).

Подготовительный синтез 8

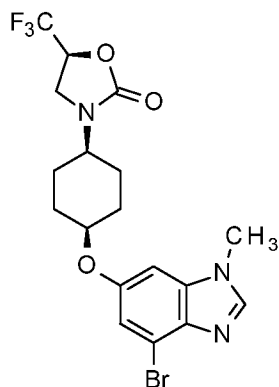
3-({*цис*-4-[(4-Бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол



Добавляли 2-(трифторметил)оксиран (2,13 мл, 1,02 экв.; э.и. 80,0%, (2R) является основным энантимером) к раствору *цис*-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанамина (7,90 г, 24,37 ммоль) в изопропанол (130 мл). Нагревали при 70 °С в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя пошаговым градиентом от 100% этилацетата до 2,5%, до 5%, до 7,5%, до 10% метанола в этилацетате, с получением указанного в заголовке соединения (7,86 г, 74%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 436/438 (M+H).

Подготовительный синтез 9

(5S)-3-({*цис*-4-[(4-Бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-он



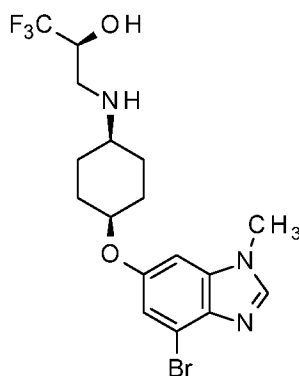
Смешивали 3-({*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (3,34 г, 7,66 ммоль; э.и. 80,0%, (2R) является основным энантимером), 1,1'-карбонилдиимидазол (2,48 г, 2,00 экв.) и 4-

диметиламинопиридин (0,094 г, 0,10 экв.) в дихлорметане (38,3 мл). Перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 0-5% метанола в дихлорметане, с получением 3-{*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-она (3,28 г; э.и. 80,0%, (5R) является основным энантиомером).

Разделяли полученный выше продукт в следующих условиях хиральной хроматографии с получением указанного в заголовке соединения (0,32 г, 9%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 462/464$ (M+H): Энантиомер 1, э.и. >99%, 75%/25% CO₂/MeOH, 5 мл/мин., 4,6 x 150 мм, Chiralpak AD-H.

Подготовительный синтез 10

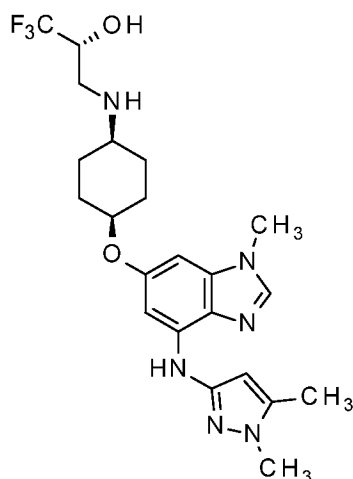
(2S)-3-({*цис*-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол



Смешивали (5S)-3-({*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-он (0,32 г, 0,69 ммоль) и триметилсиланолат калия (0,36 г, 4,00 экв.) в тетрагидрофуране (7 мл). Перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение шести дней. Разбавляли водой. Фильтровали, промывали водой и сушили под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (0,22 г, 73%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 436/438$ (M+H).

Пример 1

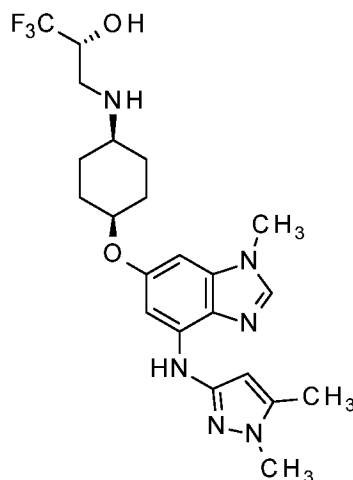
(2R)-3-({*цис*-4-({4-[(1,5-Диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол



Смешивали (2R)-3-((*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,20 г, 0,46 ммоль), 1,5-диметилпиразол-3-амин (0,056 г, 1,1 экв.), карбонат калия (0,158 г, 2,5 экв.), 2-(ди-*трет*-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,046 г, 0,20 экв.), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,042 г, 0,10 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в *трет*-бутиловом спирте (5 мл). Закрывали винтовой крышкой. Нагревали в микроволновом реакторе при 120 °С в течение 45 минут. Концентрировали реакцию смесь *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя пошаговым градиентом от 100% этилацетата до 1%, до 2,5%, до 5% метанола в этилацетате, с получением указанного в заголовке соединения (0,071 г, 33%). МС (ЭР) $m/z = 467$ (M+H).

Альтернативный пример 1

(2R)-3-{{*цис*-4-({4-[(1,5-Диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол



Смешивали (2R)-3-((*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (50 г, 115 ммоль), 1,5-

диметилпиразол-3-амин (18,25 г, 1,43 экв.) и карбонат калия (50 г, 3,16 экв.) в 2-метилбутан-2-оле (400 мл). Перемешивали и дегазировали с помощью линии барботирования азота в течение 15 минут. Добавляли 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (2,20 г, 0,034 экв.) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (1,60 г, 0,015 экв.). Перемешивали и дегазировали с помощью линии барботирования азота в течение пяти минут. Добавляли уксусную кислоту (3 мл). Нагревали до кипения с обратным холодильником в атмосфере азота в течение двадцати часов. Добавляли 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (1,10 г, 0,017 экв.) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,80 г, 0,0075 экв.). Нагревали до кипения с обратным холодильником в атмосфере азота в течение трех часов. Концентрировали реакцию смесь *in vacuo*. Разбавляли водой (500 мл). Подкисляли 35% водным раствором хлористоводородной кислоты до pH 1. Добавляли этилацетат (100 мл) и перемешивали в течение пяти минут. Обработывали перемешиваемую смесь активированным древесным углем (5 г) и фильтровали через диатомовую землю. Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Водный слой подщелачивали 30% мас./мас. водным раствором гидроксида аммония до pH 10. Фильтровали с получением твердого вещества. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя 10% смесью 2 М раствора аммиака в метаноле в дихлорметане, с получением указанного в заголовке соединения (52 г, 95%). МС (ЭР) $m/z = 467$ (M+H).

Второй альтернативный пример 1

(2R)-3-{[*цис*-4-({4-[(1,5-Диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол, кристаллическая форма I

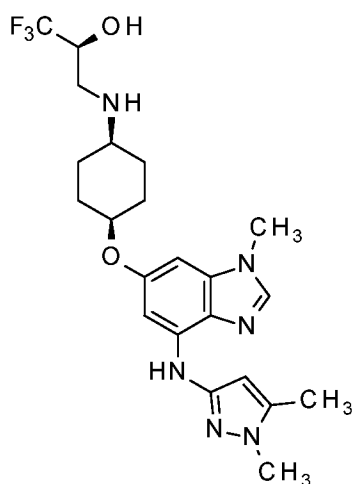
А: Растворяли часть продукта, полученного нормально-фазовой хроматографией в альтернативном примере 1 (1,60 г), в смеси 9:1 ацетона:воды (45 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и добавляли SiliaBond® DMT (0,42 г). Фильтровали через пять часов при комнатной температуре. Концентрировали фильтрат для удаления всего ацетона, затем разбавляли водой (10 мл). Фильтровали и сушили под вакуумом с получением кристаллического вещества (1,37 г). МС (ЭР) $m/z = 467$ (M+H).

В: Суспендировали продукт, полученный нормально-фазовой хроматографией в альтернативном примере 1 (47,0 г), в изопропанол (1,15 л). Нагревали смесь до кипения с обратным холодильником с получением раствора. Добавляли стекловидный углерод (6 г). Через один час кипячения с обратным холодильником фильтровали через диатомовую

землю. Промывали изопропанолом (50 мл) и вносили в фильтрат заправку кристаллического вещества, полученного в подразделе А, приведенном непосредственно выше (0,20 г, по частям). Перемешивали и оставляли остывать до комнатной температуры в течение двух часов. Фильтровали и сушили под вакуумом с получением кристаллического вещества (37,8 г). МС (ЭР) $m/z = 467$ (M+H).

Пример 2

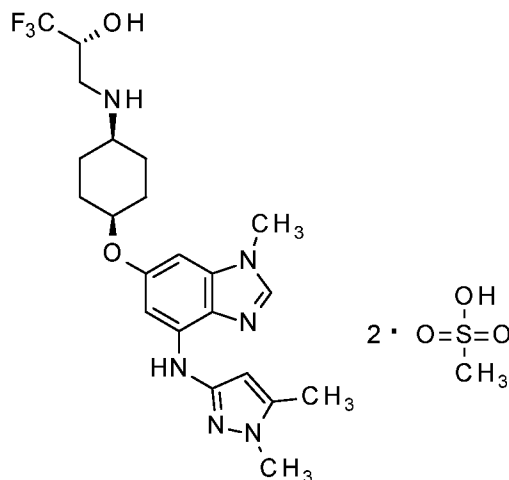
(2S)-3-{{*цис*-4-({4-[(1,5-Диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил}амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол



Смешивали (2S)-3-({*цис*-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,077 г, 0,18 ммоль), 1,5-диметилпиразол-3-амин (0,030 г, 1,45 экв.), карбонат калия (0,060 г, 2,46 экв.), 2-(ди-*трет*-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,022 г, 0,25 экв.), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,0080 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в *трет*-бутиловом спирте (2,5 мл). Закрывали винтовой крышкой. Нагревали при 95 °С в течение ночи. Разбавляли этилацетатом и фильтровали через диатомовую землю. Концентрировали фильтрат *in vacuo*. Очищали нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 5-100% В (А: дихлорметан; В: 15% смесь 0,75 М раствора аммиака в метаноле в дихлорметане). Дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 5-100% В (А: 10 нМ водный раствор бикарбоната аммония с 10% метанола; В: ацетонитрил). Концентрировали чистые фракции от этанола, затем снова концентрировали от дихлорметана с получением указанного в заголовке соединения (0,054 г, 65%). МС (ЭР) $m/z = 467$ (M+H).

Пример 3

(2R)-3-{{цис-4-({4-[(1,5-Диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол; диметансульфовая кислота



Смешивали (2R)-3-{{цис-4-({4-[(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1,1-трифторпропан-2-ол (1,00 г, 2,15 ммоль) и ацетон (35 мл). Нагревали при 51 °С и по каплям добавляли раствор метансульфоновой кислоты (0,30 мл, 2,10 экв.) в ацетоне (5 мл). Перемешивали при 51 °С в течение одного часа, а затем охлаждали до комнатной температуры. Фильтровали полученное твердое вещество и сушили в вакуумной печи при 70 °С в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (1,25 г, 88%).

Рентгеновская порошковая дифракция

Диаграммы РПД кристаллических твердых веществ получали на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavor, оснащенный источником CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до 40° 2 θ с шагом 0,009° 2 θ и скоростью сканирования 0,5 секунд/шаг, и с дивергенцией 0,6 мм, с неподвижной 5,28 мм антирассеивающей и 9,5 мм детекторной щелями. Сухой порошок упаковывали в кварцевый держатель образца и обеспечивали гладкую поверхность с помощью предметного стекла. Диаграммы дифракции кристаллической формы получали при температуре и относительной влажности окружающей среды. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности пиков дифракции могут варьироваться из-за предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и форма кристалла. При наличии эффекта предпочтительной ориентации, интенсивности пиков являются переменными, но положения характеристических пиков полиморфа не меняются. См., например, фармакопею США №23, национальный формуляр №18, страницы 1843-

1844, 1995. Кроме того, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пиков могут незначительно варьироваться. Например, положения пиков могут смещаться вследствие изменения температуры или влажности, при которых анализируют образец, вследствие смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В представленном случае вариабельность положения пика, составляющая $\pm 0,2^\circ 2\theta$, учитывает указанные возможные отклонения, не препятствуя точному определению указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть основано на любой уникальной комбинации характеристических пиков (в единицах $^\circ 2\theta$), как правило, более выраженных пиков. Диаграммы дифракции кристаллической формы, полученные при температуре и относительной влажности окружающей среды, корректировали в соответствии со стандартными пиками NIST 675 при $8,853^\circ$ и $26,774^\circ 2\theta$.

Характеристики полученного образца соединения из второго альтернативного примера 1 получали с помощью диаграммы РПД, используя излучение CuKa, имеющей пики дифракции (значения 2θ), представленные ниже в таблице 1, и, в частности, имеющей пики при $19,5^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $11,9^\circ$, $15,4^\circ$ и $17,6^\circ$; с допуском углов дифракции $0,2^\circ$.

Таблица 1: Пики рентгеновской порошковой дифракции второго альтернативного примера 1

Пик	Угол ($^\circ 2$ -тета) +/- 0,2 $^\circ$	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	6,4	17,0%
2	11,9	46,6%
3	14,7	11,7%
4	15,4	41,9%
5	16,2	27,5%
6	16,9	24,9%
7	17,6	40,1%
8	19,5	100,0%
9	20,8	32,1%
10	21,5	19,6%

Характеристики полученного образца соединения из примера 3 получали с помощью диаграммы РПД, используя излучение CuKa, имеющей пики дифракции (значения 2θ),

представленные ниже в таблице 2, и, в частности, имеющей пики при $21,7^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $21,2^\circ$, $18,0^\circ$ и $15,7^\circ$; с допуском углов дифракции $0,2^\circ$.

Таблица 2: Пики порошковой рентгеновской дифракции примера 3

Пик	Угол ($^\circ 2$ -тета) +/- $0,2^\circ$	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	5,6	26,2%
2	10,0	25,7%
3	13,1	28,7%
4	15,7	70,0%
5	18,0	90,5%
6	19,6	64,5%
7	20,6	41,8%
8	21,2	99,3%
9	21,7	100,0%
10	22,3	59,9%

Ферментные анализы JAK1, JAK2 и JAK3 *in vitro*

Для определения способности исследуемых соединений ингибировать активность киназ JAK1, JAK2 и JAK3 использовали анализ киназ JAK LanthaScreen™ (Invitrogen). В указанных форматах анализа TR-FRET используют антитело, меченое изотопом тербия с большим периодом полураспада, в качестве донорных частиц, и GFP-STAT1 в качестве акцепторных частиц. Для контролирования активности киназы JAK использовали отношение TR-FRET, где увеличение фосфорилирования GFP-STAT1 приводит к повышению отношения TR-FRET. Реакцию киназы проводили в реакционном объеме 12,5 мкл на мелком черном 384-луночном планшете Proxiplate. Для получения конечных реакционных условий добавляли реагенты: 50 мл HEPES с pH, 1,76 мМ Triton X-100, АТФ (20,0 мкМ для ферментных анализов JAK1 и JAK3 или 5 мкМ для ферментных анализов JAK2), 10,0 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТК и 0,01% Brij-35, 0,05 мМ GFP-STAT1, 14 нМ фермента JAK1 для ферментных анализов JAK1, 1,0 нМ для ферментных анализов JAK2 или 2,5 нМ для ферментных анализов JAK3 и 4% ДМСО, и использовали серийные разбавления исследуемых соединений (разбавленные 1:3 от 20000 до 1 нМ). После добавления АТФ/GFP-STAT1 центрифугировали аналитические планшеты в течение 1 минуты при

скорости 1000 оборотов в минуту (об./мин.). Оставляли планшеты инкубироваться при комнатной температуре в течение 60 минут, а затем добавляли 12,5 мкл останавливающего буфера, содержащего 20 mM ЭДТК, 2 нМ меченого тербием антитела против фосфорилированных сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции [фосфорилированная аминокислота тирозин 701] (Tb-анти-pSTAT1) [pTyr701], 0,67 mM трис(гидроксиметил)аминоэтана гидрохлорида (Trizma®) с pH 7,5, 0,02% NaN₃ и 0,01% нонилфенилполиэтиленгликоля (Nonidet ® P40). Инкубировали при комнатной температуре в течение 90 минут и считывали на планшет-ридере EnVision с фильтром длины волны возбуждения 340 нм и фильтрами длины волны излучения 520 нм и 495 нм. Определяли отношение по длине волны излучения для GFP-STAT1, которую измеряли при 520 нм, относительно излучения при 495 нм для (Tb-анти-pSTAT1) [pTyr701]. Для каждого соединения определяли значение IC₅₀, используя данные процентного ингибирования, которые рассчитывали по данным реакции относительно контрольных образцов на планшете (активный фермент относительно фермента, ингибированного тофацитинибом в концентрации 2,0 mM). Для аппроксимации данных процентного ингибирования при десяти концентрациях соединения к четырехпараметрическому логистическому уравнению использовали ACTIVITYBASE 4.0.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение из примера 1 демонстрировало значение IC₅₀ в отношении JAK1 $4,0 \pm 0,8$ нМ (n=6), IC₅₀ в отношении JAK2 557 ± 337 нМ (n=6), и IC₅₀ в отношении JAK3 1910 ± 786 нМ (n=6). Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 ингибирует фермент JAK1 *in vitro*. Полученные результаты также демонстрируют, что соединение примера 1 является более эффективным ингибитором фермента JAK1 и селективным по сравнению с JAK2 и JAK3 *in vitro*.

Анализ пролиферации клона 12 ВаF3 с мутантной JAK-1 (S729C)

Цель данного анализа заключалась в определении ингибирующей активности специфических ингибиторов JAK-1 с применением анализа пролиферации клона 12 ВаF3 с мутантной JAK-1 (S729C).

Клеточную линию, экспрессирующую mtJAK1 (S729C), создавали посредством трансдукции клеток Ва/F3 (мышинных про-B-клеток) ретровирусом, экспрессирующим векторную ДНК человеческой mtJAK1 (S729C)-pQCXIN. Проводили одно клонирование клеток для отбора клеток Ва/F3, экспрессирующих максимальные концентрации mtJAK1 (S729C), посредством серийного разбавления. Клеточную суспензию ВаF3 с мутантной

JAК-1 (S729C) выращивали и поддерживали в среде (Gibco RPMI 1640, кат. № A10491-01), содержащей 10% Hi-FBS (Hyclone, кат. № 10082-047), 1 мкг/мл пуромицина дигидрохлорида (Sigma, кат. № 9620), 1,0 мг/мл G418 сульфата (Corning, ссыл. № 30-234-CI), здесь и далее упоминаемой как R10+.

Анализы пролиферации проводили в культуральной среде без отбора, которая здесь и далее упомянута как (R10-). Вкратце, выращенные клетки декантировали, центрифугировали и восстанавливали в 10 мл R10-, и считывали с помощью прибора Beckman Coulter Vi-Cell. Клетки дополнительно разбавляли до 2×10^4 /мл в R10- и помещали на 96-луночные белые матовые аналитические планшеты (Costar, кат. № 3610) в концентрации 1×10^3 клеток (50 мкл) на лунку. В соответствующих 96-луночных полипропиленовых планшетах разбавляли исследуемые соединения в 100% ДМСО, затем дополнительно разбавляли в R10- с получением 2X матрицы исследуемого соединения. Разбавленные исследуемые соединения добавляли в соответствующий клеточный планшет с получением CRC от 20 мкМ до 0,001 мкМ. В каждый планшет включали минимальные и максимальные контрольные образцы. В качестве минимального контроля использовали стауроспорин (конечная концентрация 1 мкМ), а в качестве максимального контроля использовали ДМСО, содержащий R10- в таком же количестве, как CRC. Планшеты покрывали заполненными водой испарительными крышками Microcline (кат. № LLS-0310) и инкубировали при 37 °C в 5% CO₂ в течение 3 дней. Через 3 дня инкубации планшеты вынимали из инкубатора и оставляли остывать до комнатной температуры. После охлаждения планшеты проявляли посредством добавления 100 мкл Cell Titer Glo (Promega, кат. № G7571), перемешивали в течение 2 минут на смесителе для планшетов и инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре. Затем считывали люминесценцию на приборе Perkin Elmer Victor2, используя введенную в память программу для считывания люминесценции с 0,1 секунды. Кривые IC₅₀ строили с помощью внутренней программы STATS TMAГ и GraphPad Prism версии 4.03.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение IC₅₀ 956 нМ ± 217 нМ (n=4). Полученный результат демонстрирует, что соединение примера 1 активно против mtJAК1 (S729C), экспрессируемой в клетках Ва/F3.

Клеточный анализ p-STAT3-(p-Tyr705)-IL6-TF-1-JAK1 по протоколу AlphaScreen SureFire

Клеточный анализ JAK1, описанный ниже, использовали для определения эффективности исследуемых соединений в отношении JAK1 в клетках.

Получение клеток:

Выдерживали клетки TF-1 в среде DMEM с 0,5% 26400 (FBS) и 1X Pen/Strep при 37 °С. Помещали 100 тыс. клеток на лунку в 96-луночные черные планшеты BD с прозрачным дном. Выдерживали планшеты при комнатной температуре в течение 30-60 минут, затем инкубировали в течение ночи при 37 °С и 5% CO₂. Подсчитывали клетки с помощью счетчика Vi-Cell, используя клеточную суспензию с концентрацией 100 клеток/мл, и помещали 100 мкл на лунку в планшеты Beckman Dickinson Bioscoat (кат. № 354640).

Получение исследуемого соединения и обработка:

Получали серийные разбавления соединений 1:3 в ДМСО и дополнительно разбавляли в указанной среде. Исследовали соединения в диапазоне 10 точек концентрации от 20000 до 1 нМ. Добавляли разбавленное соединение в соответствующие клеточные планшеты. Инкубировали планшеты при 37 °С в течение 20 минут. В соответствующие клеточные планшеты добавляли раствор IL6 в конечной концентрации 30 нг/мл и продолжали инкубировать при 37 °С в течение 30 минут. Удаляли среду и добавляли 50 мкл 1x лизисного буфера в каждую лунку.

Обнаружение pSTAT3:

Последовательно выполняли следующие стадии: получали акцепторную смесь (активирующий буфер/ реакционный буфер/ акцепторные гранулы); переносили 4 мкл лизата из 96-луночных планшетов в 384-луночные планшеты Proxiplate; добавляли 5 мкл акцепторной смеси в 384-луночный планшет(-ы) Proxiplate и закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 минуты на встряхивателе для планшетов; инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании; получали донорную смесь (донорные гранулы в буфере для разбавления); добавляли 2 мкл донорной смеси в аналитические планшеты; закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 минуты на встряхивателе для планшетов; инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании; считывали планшеты с помощью Envision; протокол AlphaScreen Surefire 384.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение IC_{50} $87 \text{ нМ} \pm 75$ ($n=10$). Полученный результат демонстрирует, что соединение примера 1 ингибирует фермент JAK1 в клеточном анализе.

Клеточный анализ H1975-JAK1 по протоколу ACUMEN для фосфо-STAT3 (Tyr705)

Клеточный анализ H1975-JAK1 использовали для подтверждения эффективности исследуемых соединений в клетках NSCLC, в которых путь STAT3 активирован аутокринной петлей IL-6.

Получение клеток:

Последовательно выполняли следующие стадии: изучали клетки под микроскопом; аспирировали среду из клеток с помощью стерильной вакуумной пипетки; промывали клетки, используя примерно 5 мл PBS; аспирировали PBS с помощью стерильной вакуумной пипетки; добавляли 5 мл 0,25% раствора трипсина-ЭДТК в колбу объемом 150 см²; осторожно покачивали колбу, чтобы покрыть клетки трипсином, и оставляли стоять под вытяжкой в течение 3 минут или устанавливали колбу в инкубатор на 3 минуты для отделения клеток от колбы; несколько раз встряхивали колбу, чтобы отделить клетки; добавляли в колбу 10 мл питательной среды, осторожно распределяли суспензию на той стороне колбы, где происходил рост клеток, и перемешивали в пипетке для измельчения клеток; центрифугировали (1300 об./мин. в течение 5 минут), повторно суспендировали в 10 мл питательной среды; фильтровали через клеточный фильтр (BD Falcon 352350, клеточный фильтр 70 мкм); собирали клетки в стерильную коническую пробирку объемом 50 мл; подсчитывали клетки с помощью счетчика Vi-Cell (0,5 мл клеток).

День 1: Помещали 30000 клеток на лунку в 96-луночные черные планшеты BD с прозрачным дном. Подсчитывали клетки с помощью счетчика Vi-Cell, использовали клеточную суспензию с концентрацией 300000 клеток/мл и помещали 100 мкл/лунку на планшеты Beckman Dickinson Bioscoat, кат. № 354640. Поддерживали планшеты при комнатной температуре в течение 30-60 минут, затем устанавливали их в инкубатор. Затем инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂.

Получение соединения и обработка:

Подготавливали планшет с глубокими лунками, содержащий 1 мл среды без FBS с 0,6% ДМСО, затем добавляли 2 мкл соединения (10 мМ раствор в ДМСО) с получением

планшета с исходным 20 мкМ раствором. Проводили серийные разбавления 1:3 соединений в среде без FBS с 0,6% ДМСО на планшетах для разбавления. Исследовали соединения в диапазоне 10 точек концентрации от 20 мкМ до 1 нМ. Удаляли среду из аналитических планшетов с клетками. Переносили 100 мкл соединений из планшета для разбавления в аналитические планшеты (планшеты Beckman Dickinson Biocoat, кат. № 356440), содержащие клетки, связанные с 100 мкл среды, и использовали программу ТЕМО: КЛЕТОЧНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРЕНОСА ОБРАЗЦА, с помощью медленного дозатора Gem 3797. Затем инкубировали клетки в течение 4 часов при 37 °С.

Обнаружение pSTAT3:

На 1 день последовательно проводили следующие стадии: удаляли среду; добавляли 100 мкл 3,7% пара-формальдегида; инкубировали в течение 30 минут в темноте; промывали с помощью 100 мкл PBS; добавляли 100 мкл холодного метанола; инкубировали в течение 15 минут в темноте; промывали 2 раза, используя 100 мкл PBS; добавляли 100 мкл блокирующего раствора (1% BSA в PBS); инкубировали в течение 30 минут в темноте; добавляли 50 мкл первичного антитела pSTAT3 1:500 (в блокирующем растворе: 1% BSA; мышинное анти-фосфо-STAT3(Тyr705)); закрывали планшеты алюминиевой фольгой и инкубировали при 4 °С при осторожном встряхивании в течение ночи.

На 2 день последовательно проводили следующие стадии: 2 раза промывали с помощью 100 мкл PBS; добавляли 50 мкл вторичного антитела (1:1000; Ab2° козье анти-мышинное IgG); инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте; 2 раза промывали с помощью 100 мкл PBS; добавляли 100 мкл йодида пропидия (1:1000 в PBS из имеющегося в продаже раствора), содержащего РНКазу (50 мкг/мл в PBS); закрывали планшеты прозрачной пленкой и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов перед считыванием; считывали на приборе Acumen Explorer (параметры настраивали на основании положительной и отрицательной лунки). Лазер (1 сканирование) 488 нм.

Обработка данных:

Данные обрабатывали с помощью базы активностей и анализировали, используя 4-параметрическое нелинейное логистическое уравнение (четырёхпараметрическую логистическую кривую зависимости ответа от концентрации):

$$Y = \text{ниж.} + [(\text{ниж.}-\text{верх.}) / (1 + (x/IC50)^{\text{угол}})]$$

где Y = % ингибирования, X = концентрация, обеспечивающая y% ингибирование, ниж. = минимальное значение y на кривой, верх. = максимальное значение y на кривой, и угол = крутизна кривой при IC50.

$$\% \text{Инг.} = [(\text{среднее Max- x} / \text{среднее Max} - \text{среднее Min})] \cdot 100$$

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение IC_{50} 297 нМ (n=1). Полученный результат демонстрирует, что соединение примера 1 активно против JAK1 в клетках NSCLC, в которых путь STAT3 активирован аутокринной петлей IL-6.

Клеточный анализ p-STAT5 (p-Tyr694/699)-EPO-JAK2 по протоколу AlphaScreen SureFire

Кратность селективности исследуемых соединений в отношении JAK1 по сравнению с JAK2 определяли с помощью клеточного анализа, в котором использовали EPO для активации пути JAK2-STAT5, и использовали pSTAT5 в качестве считываемого параметра.

Получение клеток:

Выдерживали клетки UT-7 в течение ночи в среде DMEM с 0,5% 1600 (FBS) и 1X Pen/Strep при 37 °C (без GM-CSF). Помещали 50000 клеток на лунку на 96-луночные черные планшеты BD с прозрачным дном (в среде без FBS и GM-CSF). Выдерживали планшеты при комнатной температуре в течение 30-60 минут, затем инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. Подсчитывали клетки с помощью счетчика Vi-Cell, используя клеточную суспензию с концентрацией 500000 клеток/мл, и помещали 100 мкл на лунку в планшеты Beckman Dickinson Bioscoat, кат. № 354640.

Разбавление соединения и обработка:

Исследовали соединения в диапазоне 10 точек концентрации от 20000 до 1 нМ. Получали серийные разбавления соединений 1:3 в ДМСО и дополнительно разбавляли в указанной среде. Добавляли разбавленное соединение в соответствующие клеточные планшеты и инкубировали при 37 °C в течение 20 минут, затем добавляли 20 мкл EPO (295 нг/мл, конечная концентрация 45 нг/мл) в соответствующие клеточные планшеты, продолжали инкубировать при 37 °C в течение 30 минут.

Лизис клеток:

Среду сливали (осторожно) и добавляли 50 мкл 1х лизисного буфера в каждую лунку (лизат замораживали в течение ночи). (лизисный буфер: 5X; разбавляли в воде до конечной концентрации 1X).

Обнаружение p-STAT5:

Последовательно выполняли следующие стадии: получали акцепторную смесь (активирующий буфер/ реакционный буфер/ акцепторные гранулы); переносили 4 мкл лизата из 96-луночных планшетов в 384-луночные планшеты Proxiplate; добавляли 5 мкл акцепторной смеси в 384-луночный планшет(-ы) Proxiplate с помощью дозатора Multidrop Combi; и закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 минуты на встряхивателе для планшетов; инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании; получали донорную смесь (донорные гранулы в буфере для разбавления); добавляли 2 мкл донорной смеси в аналитические планшеты с помощью дозатора Multidrop Combi; закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 минуты на встряхивателе для планшетов; инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании; считывали планшеты с помощью Envision; протокол AlphaScreen Surefire 384.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение IC_{50} 11,8 мкМ \pm 5,4 (n=5). Полученный результат демонстрирует, что соединение примера 1 является селективным в отношении JAK1 по сравнению с JAK2 в клеточном анализе, в котором использовали EPO для активации пути JAK2-STAT5.

Анализы цельной крови человека: Определение pSTAT3 (JAK1) и pSTAT5 (JAK2) в лимфоцитах и моноцитах.

Анализы цельной крови человека (НWB) разрабатывали и валидировали для определения селективности исследуемых соединений в отношении JAK1 и JAK2.

Разбавляли исследуемые соединения (1:3) в 100% ДМСО с получением 10 точек, а затем в PBS + 0,1% BSA. Тофацитиниб использовали в качестве эталонного соединения в каждом планшете, а также максимальный сигнал (стимулированные лунки) и минимальный сигнал (отсутствие стимулированных лунок) для нормирования данных. Получали пул НWB от 4 различных здоровых доноров. Помещали кровь в 96-луночный планшет с помощью Tecan Evo 96w и инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 1 часа при комнатной температуре. По истечении указанного времени инкубации стимулировали

HWB, используя IL6 (206-IL, R&D System) и GM-CSF (PHC2015, Life Technologies), в течение следующих 15 минут. Добавляли краситель для определения жизнеспособности (65-0865, eBioscience) (1:1000) с помощью Tecan Evo 96w (5xmix).

Конечные концентрации в анализе были следующими: 100 мкМ соединений, 50 мкМ тофацитиниба, 0,1 мкг/мл IL6, 0,038 мкг/мл GM-CSF и 1% ДМСО. Лизировали и фиксировали HWB с помощью лизисного/фиксирующего буфера (558049, Vecton Dickinson), добавляя 900 мкл лизисного буфера с помощью Tecan Evo 96w (смешивали 10x при высокой скорости). Инкубировали HWB на бане при 37 °C в течение 10 минут. Центрифугировали HWB при 500G в течение 8 минут и отбрасывали надосадочный раствор. Добавляли холодный метанол с помощью Tecan Evo 96w для повышения проницаемости клеток. Инкубировали кровяные клетки на льду в течение 30 минут. После этого промывали клетки 2x, используя окрашивающий буфер (554656, Vecton Dickinson), центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 2 минут, отбрасывали надосадочный раствор и добавляли следующие антитела: анти-человеческое CD4 PE, 1:100 (12-0048, eBioscience), анти-человеческое CD33 eFluor® 450, 1:50 (48-0337, eBioscience), фосфо-STAT5 (Tyr694) (C71E5) кроличье mAb, 1:100 (Alexa Fluor® 488, конъюгат) (3939, Cell Signalling) и фосфо-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP™ кроличье mAb 1:200, (Alexa Fluor® 647, конъюгат) (4324, Cell Signalling). Инкубировали антитела в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре, затем промывали клетки 2x и считывали на цитометре Macsquant (Miltenyi Biotec). Получали данные на CD4⁺ (лимфоциты) и CD4^{Low} CD33^{Hi} (моноциты) для измерения флуоресценции в клетках, экспрессирующих pSTAT3 и pSTAT5, соответственно. Анализировали данные с помощью FlowJo версии 10 и нормировали среднюю флуоресценцию относительно максимального и минимального сигнала для определения значений IC₅₀. Для построения кривых зависимости ответа от дозы использовали программу Graph Pad prism 5.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение IC₅₀ 2,40 ± 0,64 мкМ (n=3) для JAK1 и IC₅₀ 13,0 ± 3,2 мкМ (n=3) для JAK2. Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 демонстрирует примерно в 5 раз более высокую эффективность в отношении JAK1, по сравнению с JAK2, в анализе цельной крови человека.

Анализ мышинового IVTI (JAK1) pSTAT3

Цель данного анализа заключалась в измерении способности исследуемых соединений ингибировать фосфорилирование STAT3 (активацию STAT3) в мышинной

модели ксенотрансплантата H1975. Клетки H1975 выращивали в соответствии со спецификацией Американской коллекции типовых культур (ATCC) при минимальном возможном количестве пересевов. Выращивали и поддерживали клетки в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и инкубировали при 37 °C в 5% CO₂. Собирали клетки стандартными способами и смешивали с матрицей базальной мембраны BD Biosciences (MATRIGEL®), чтобы достичь в клеточной суспензии отношения клеток к матрице 1:1, с получением объема для инокуляции 0,2 мл клеток в матричной суспензии, содержащей 5e6 клеток. В течение процедуры инокуляции клеточные суспензии выдерживали на льду, и начинали имплантацию в течение одного часа после сбора клеточной культуры. Все имплантаты вводили подкожно в правый задний бок самок бестимусных голых мышей, приобретенных у компании Harlan. Всех мышей кормили *ad libitum* кормом Harlan Teklad № 2920X и обеспечивали воду в гелевых пакетах. Обеспечивали возможность роста имплантированных опухолевых клеток до солидных опухолей и дважды в неделю измеряли вместе с массой тела, начиная через 5-9 дней после имплантации. Объем опухоли определяли по уравнению: $0,536 * L * W^2$. По достижении объема опухоли около 200-250 мм³, животных рандомизировали, используя многозадачное устройство для блочной рандомизации и помещали в группу, которую лечили носителем, содержащую 6-10 животных, и в несколько экспериментальных групп, содержащих по 6 животных. Исследуемые соединения составляли в композиции в 1% растворе носителя ГЭЦ, содержащем 0,25% Tween 80 и 0,05% противопенного агента с 1,1 мол. экв. метансульфоновой кислоты для *in situ* образования соли. В контрольную группу, которую лечили носителем, кислоту не добавляли. Дозы рассчитывали на основании последних данных измерения средней массы в группе. Соединения вводили через ротовой зонд для проведения исследований зависимости ответа от дозы и для определения периода действия препарата. Исследования зависимости ответа от дозы проводили посредством введения однократной дозы за 2 часа до извлечения, переработки и замораживания опухоли. Исследования для определения периода действия препарата проводили посредством введения однократной дозы, равной TED₇₀, определенной в исследовании зависимости ответа от дозы.

Переработка опухолевой ткани:

Собирали и разрезали опухоли с получением фрагментом размером около 150-250 мм³ и сразу опускали в пробирку размером 12X75 мм, содержащую 1 мл ледяного лизисного буфера MSD Tris (Meso Scale Discovery, кат. № R60TX-2) и 1X HALT (Thermo Scientific, продукт № 1861281). Гомогенизировали образцы в течение примерно 15 секунд, используя

одноразовый наконечник-гомогенизатор образцов для твердых тканей Omni (Omni International, кат. № 3_750H) и оставляли стоять на влажном льду в течение следующих 15-25 минут, затем переносили в морозильную камеру при -60°C и выдерживали в течение ночи. Вынимали образцы из морозильной камеры и оставляли стоять при комнатной температуре для инициации оттаивания. Как только образцы начинали таять, их переносили на влажный лед и продолжали оттаивать. По завершении оттаивания образцы перемешивали на вортексе и переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,8 мл. Центрифугировали лизаты при $14000\times g$ в течение 30-60 минут при 4°C . Переносили лизаты (200 мкл) в 96-луночный полипропиленовый планшет (Costar, кат. № 3879). Определяли концентрацию белка с помощью набора для анализа белка Pierce BCA (кат. № 23225), как описано ниже. Вкратце, вычерчивали стандартную кривую, используя стандарт BSA, разбавленный в лизисном буфере RIPA, содержащем 1X HALT, с получением рабочего диапазона от 2000 мкг/мл до 25 мкг/мл. Все лизаты разбавляли 1:10 в лизисном буфере RIPA, содержащем 1X HALT. Отбирали пипеткой 25 мкл стандартных и экспериментальных образцов в 96-луночный планшет (Falcon, кат. № 353072) и добавляли 200 мкл рабочего реагента в каждую лунку, и тщательно перемешивали планшет на встряхивателе для планшета в течение 30 секунд. Планшет закрывали и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Планшет охлаждали до комнатной температуры и измеряли поглощение при 562 нм или около указанного значения с помощью прибора Molecular Devices Spectra Max. Концентрации белка для каждого образца определяли с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.3. После количественного анализа образцов опухоли замораживали лизаты при -80°C в 96-луночном полипропиленовом планшете и анализировали позже.

Измерение pSTAT3:

Анализ pSTAT3 (Tyr705) проводили следующим образом. Использовали аналитический набор pSTAT3 MSD производства компании Meso Scale Discovery (кат. № K150DID-2). Вместо набора ингибиторов фосфатазы и протеазы можно использовать 100X ингибиторы протеазы и фосфатазы HALT на основании простоты применения и проведения работы. Получали лизисный буфер MSD Tris, добавляя 100X ингибитора протеазы и фосфатазы HALT до 1X конечной концентрации, который обозначали как полный лизисный буфер MSD. Вынимали образцы опухоли из морозильной камеры при -80°C и оставляли стоять при комнатной температуре для инициации оттаивания. Во время оттаивания образцов блокировали накопительный планшет с pSTAT3 Tyr705 (кат. № K150DID-2) с помощью 150 мкл блокирующего раствора в течение не менее 1 часа при

комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Перед встряхиванием закрывали планшеты клейкой крышкой планшета. Блокирующий раствор имел отношение Blocker A (кат. № R93BA-4) 600 мг: 20 мл 1X промывочного буфера MSD Tris (кат. № R61TX-2). Как только образцы начинали таять, их переносили на влажный лед и продолжали оттаивать. По завершении оттаивания слегка перемешивали смесь в пипетке, используя многоканальную пипетку. Нормализовали образцы в ледяном полном лизисном буфере MSD до концентрации белка 0,4 мкг/мл X 100 мкл. Выдерживали все нормализованные образцы опухоли на льду в 96-луночном полипропиленовом планшете до их добавления в накопительный планшет pSTAT3. После блокирования накопительного планшета pSTAT3 промывали 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris, используя устройство для промывания планшетов Multidrop 384 компании Thermo Labsystems. После последнего промывания планшет слегка постукивали для удаления оставшегося промывочного буфера. Добавляли общий объем 25 мкл (10 мкг) нормализованного лизата опухоли на лунку и инкубировали еще 2-3 часа при комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Во время инкубации разбавляли детекторное антитело анти-фосфо-STAT 3 с меткой сульфо-TAG, которое представлено в указанном наборе в буфере для разбавления антитела (1 мл блокирующего раствора, смешанного с 2 мл 1X промывочного буфера MSD), добавляя 60 мкл детекторного антитела анти-фосфо-STAT 3 с меткой сульфо-TAG к 2,94 мл буфера для разбавления антитела. Полученный раствор антитела выдерживали на влажном льду до использования. После инкубации лизата опухоли промывали планшет 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris. После последнего промывания постукивали планшет для удаления оставшегося промывочного буфера и добавляли 25 мкл/лунку детекторного антитела анти-фосфо-STAT 3 с меткой Sulfo-TAG. Инкубировали планшет еще 1 час при комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Во время инкубации разбавляли 4X считывающий буфер T MSD с поверхностно-активным веществом (кат. № R92TC-3) до 1X, используя деионизированную воду, и выдерживали при комнатной температуре. По завершении инкубации детекторного антитела промывали планшет 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris. После последнего промывания слегка постукивали планшет для удаления оставшегося промывочного буфера и добавляли общий объем 150 мкл/лунку 1X считывающего буфера T MSD с поверхностно-активным веществом. Считывали планшет на приборе Meso Quick Plex SQ 120. Анализировали данные, как описано ниже.

Расчет процентного ингибирования pSTAT3:

Копировали и вставляли исходные данные планшета из Meso Quick Plex SQ 120 непосредственно на рабочий лист Microsoft Excel версии 2010. Систематизировали данные в подходящем формате (зависимость от ответа от дозы или период действия), копировали и вставляли непосредственно в программу JMP версии 11 для расчета процентного ингибирования pSTAT3 (см. приведенную ниже формулу).

$[1 - (\text{сигнал обработанного образца} / \text{средний сигнал контрольного образца с носителем})] * 100$.

Определяли среднее значение в экспериментальной группе с помощью одностороннего дисперсионного анализа и сравнивали со средним значением в контрольной группе с носителем, используя критерий Даннетта.

Расчеты TED:

Определяли значения TED₅₀ и TEC₅₀ на основании исследования зависимости от ответа от дозы. TED₅₀ представляет собой дозу, необходимую для достижения 50% ингибирования pSTAT3, а TEC₅₀ представляет собой концентрацию в плазме для достижения 50% ингибирования pSTAT3, соответственно, через два часа.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение TED₅₀ 35 мг/кг и TEC₅₀ 11,1 мкМ (n=1). Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 эффективно ингибирует передачу сигналов JAK1-STAT3 (с применением pSTAT3 в качестве считываемого параметра) *in vivo* через 2 часа после перорального введения дозы. Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 также имеет ФК/ФД активность, коррелирующую с TEC₅₀.

Анализ крысиного IVT1 (JAK1) pSTAT3

Цель данного анализа заключалась в измерении способности исследуемых соединений ингибировать экспрессию pSTAT3 в крысиной модели ксенотрансплантата H1975. Клетки H1975 выращивали в соответствии со спецификацией Американской коллекции типовых культур при минимальном возможном количестве пересевов. Выращивали и поддерживали клетки в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и инкубировали при 37 °C в 5% CO₂. Собирали клетки стандартными способами и смешивали с матрицей базальной мембраны BD Biosciences (MATRIGEL®) для достижения отношения клеток к матрице 1:1, с получением объема для инокуляции 0,2 мл клеток в матричной суспензии, содержащей 2e6 клеток. В течение процедуры инокуляции клеточные суспензии

выдерживали на льду, и начинали имплантацию в течение одного часа после сбора клеточной культуры. Все имплантаты вводили подкожно в правый задний бок самок голых крыс NIH, приобретенных у компании Taconic. Всех крыс кормили *ad libitum* кормом Harlan Teklad Global Diets № 2920X и обеспечивали водой из бутылок. Обеспечивали возможность роста имплантированных опухолевых клеток до солидных опухолей и дважды в неделю измеряли вместе с массой тела. Измерение массы тела и объема опухоли начинали на 5-9 день после имплантации. Объем опухоли определяли по уравнению: $0,536 * L * W^2$. По достижении объема опухоли около 350-400 мм³, животных рандомизировали, используя многозадачное устройство для блочной рандомизации и помещали в группу, которую лечили носителем, содержащую 6 животных, и в несколько экспериментальных групп, содержащих по 6 животных. Исследуемые соединения составляли в композиции в 1% растворе носителя ГЭЦ, содержащем 0,25% Tween 80 и 0,05% противопенного агента с 1,1 мол. экв. метансульфоновой кислоты для *in situ* образования соли (1,1 мл 1 н. раствора метансульфоновой кислоты на мг соединения). В контрольную группу, которую лечили носителем, кислоту не добавляли. Дозы рассчитывали на основании последних данных измерения средней массы в группе. Все соединения вводили через ротовой зонд для проведения исследований зависимости ответа от дозы и для определения периода действия препарата. Исследования зависимости ответа от дозы проводили посредством введения однократной дозы за 2 часа до извлечения, переработки и замораживания опухоли. Исследования для определения периода действия препарата проводили посредством введения однократной дозы, равной TD_{70} , определенной в исследовании зависимости ответа от дозы. В нескольких временных точках проводили удаление, переработку и замораживание опухоли, как описано ниже.

Переработка опухолевой ткани

Собирали и разрезали опухоли с получением фрагментов размером около 200-250 м³ и сразу опускали в пробирку размером 12X75 мм, содержащую 1 мл ледяного лизисного буфера MSD Tris (Meso Scale Discovery, кат. № R60TX-2) и 1X HALT (Thermo Scientific, продукт № 1861281). Гомогенизировали образцы в течение около 15 секунд, используя одноразовый наконечник-гомогенизатор образцов для твердых тканей Omni (Omni International, кат. № 3_750H) и оставляли стоять на влажном льду в течение следующих 15-25 минут, затем переносили в морозильную камеру при -60 °С и выдерживали в течение ночи. Вынимали образцы из морозильной камеры и оставляли стоять при комнатной температуре для инициации оттаивания. Как только образцы начинали таять, их переносили на влажный лед и продолжали оттаивать. По завершении оттаивания образцы

перемешивали на вортексе и переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,8 мл. Центрифугировали лизаты при 14000Xg в течение 30-60 минут при 4 °C. Переносили лизаты (200 мкл) в 96-луночный полипропиленовый планшет (Costar, кат. № 3879) в соответствии с дизайном 96-луночной матрицы образцов. Определяли концентрацию белка с помощью набора для анализа белка Pierce BCA (кат. № 23225), как описано ниже. Вкратце, вычерчивали стандартную кривую, используя стандарт BSA, разбавленный в лизисном буфере RIPA, содержащем 1X HALT, с получением рабочего диапазона от 2000 мкг/мл до 25 мкг/мл. Все лизаты разбавляли 1:10 в лизисном буфере RIPA, содержащем 1X HALT. Отбирали пипеткой 25 мкл стандартных и экспериментальных образцов в 96-луночный планшет (Falcon, кат. № 353072) и добавляли 200 мкл рабочего реагента в каждую лунку, и тщательно перемешивали планшет на встряхивателе для планшета в течение 30 секунд. Планшет закрывали и инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Планшет охлаждали до комнатной температуры и измеряли поглощение при 562 нм или около указанного значения с помощью прибора Molecular Devices Spectra Max. Концентрации белка для каждого образца определяли с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.3. После количественного анализа образцы опухоли замораживали при -80 °C в 96-луночном полипропиленовом планшете и анализировали позже.

Измерение pSTAT3

Анализ pSTAT3 (Tyr705) проводили следующим образом. Использовали аналитический набор pSTAT3 MSD производства компании Meso Scale Discovery (кат. № K150DID-2). Вместо набора ингибиторов фосфатазы и протеазы можно использовать 100X ингибиторы протеазы и фосфатазы HALT на основании простоты применения и проведения работы. Использовали все остальные реагенты из набора. Получали лизисный буфер MSD Tris, добавляя 100X ингибитора протеазы и фосфатазы HALT до 1X конечной концентрации (обозначенный как полный лизисный буфер MSD). Вынимали образцы опухоли из морозильной камеры при -80 °C и оставляли стоять при комнатной температуре для инициации оттаивания. Во время оттаивания образцов блокировали накопительный планшет с pSTAT3 Tyr705 (кат. № K150DID-2) с помощью 150 мкл блокирующего раствора в течение не менее 1 часа при комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Перед встряхиванием закрывали планшеты клейкой крышкой планшета. Блокирующий раствор должен иметь отношение Blocker A (кат. № R93BA-4) 600 мг: 20 мл 1X промывочного буфера MSD Tris (кат. № R61TX-2). Как только образцы начинали таять, их переносили на влажный лед и продолжали оттаивать. По завершении оттаивания слегка перемешивали смесь в пипетке, используя

многоканальную пипетку. Нормализовали образцы в ледяном полном лизисном буфере MSD до концентрации белка 0,4 мкг/мкл X 100 мкл. Выдерживали все нормализованные образцы опухоли на льду в 96-луночном полипропиленовом планшете до их добавления в накопительный планшет pSTAT3. После блокирования накопительного планшета pSTAT3 промывали 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris, используя устройство для промывания планшетов Multidrop 384 компании Thermo Labsystems. После последнего промывания планшет слегка постукивали для удаления оставшегося промывочного буфера. Добавляли общий объем 25 мкл (10 мкг) нормализованного лизата опухоли на лунку и инкубировали еще 2-3 часа при комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Во время инкубации разбавляли детекторное антитело анти-фосфо-STAT 3 с меткой сульфо-TAG, которое представлено в указанном наборе в буфере для разбавления антитела (1 мл блокирующего раствора, смешанного с 2 мл 1X промывочного буфера MSD), добавляя 60 мкл детекторного антитела анти-фосфо-STAT 3 с меткой сульфо-TAG к 2,94 мл буфера для разбавления антитела. Полученный раствор антитела выдерживали на влажном льду до использования. После инкубации лизата опухоли промывали планшет 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris. После последнего промывания слегка постукивали планшет для удаления оставшегося промывочного буфера и добавляли 25 мкл/лунку детекторного антитела анти-фосфо-STAT 3 с меткой Sulfo-TAG. Инкубировали планшет еще 1 час при комнатной температуре на встряхивателе для планшетов при энергичном встряхивании (300-1000 об./мин.). Во время инкубации разбавляли 4X считывающий буфер T MSD с поверхностно-активным веществом (кат. № R92TC-3) до 1X, используя деионизированную воду, и выдерживали при комнатной температуре. По завершении инкубации детекторного антитела промывали планшет 4X, используя 250-300 мкл 1X промывочного буфера MSD Tris. После последнего промывания слегка постукивали планшет для удаления оставшегося промывочного буфера и добавляли общий объем 150 мкл/лунку 1X считывающего буфера T MSD с поверхностно-активным веществом. Считывали планшет на приборе Meso Quick Plex SQ 120. Анализировали данные, как описано ниже.

Расчет процентного ингибирования pSTAT3:

Копировали и вставляли исходные данные планшета из Meso Quick Plex SQ 120 непосредственно на рабочий лист Microsoft Excel версии 2010. Систематизировали данные в подходящем формате (зависимость ответа от дозы или период действия). Копировали и

вставляли непосредственно в программу JMP версии 11 для расчета процентного ингибирования pSTAT3 (см. приведенную ниже формулу).

$[1 - (\text{сигнал обработанного образца} / \text{средний сигнал контрольного образца с носителем})] * 100$.

Определяли среднее значение в экспериментальной группе с помощью одностороннего дисперсионного анализа и сравнивали со средним значением в контрольной группе с носителем, используя критерий Даннетта.

Расчеты TED:

Определяли значения TED₅₀ и TEC₅₀ на основании исследования зависимости ответа от дозы. TED₅₀ представляет собой дозу, необходимую для достижения 50% ингибирования pSTAT3, а TEC₅₀ представляет собой концентрацию в плазме, необходимую для достижения 50% ингибирования pSTAT3, соответственно, через два часа.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало значение TED₅₀ 9 мг/кг и TEC₅₀ 3,9 мкМ (n=1). Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 поражает мишень в крысиной модели IVTI H1975.

Исследование эффективности в модели ксенотрансплантата опухоли HCC827

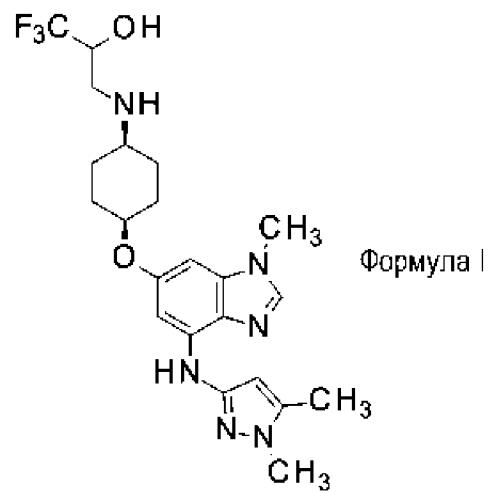
Цель данного анализа заключалась в измерении способности соединений ингибировать рост опухоли в мышинной модели ксенотрансплантата HCC827. Клетки HCC827 (ATCC № CRL-2868, партия № 59392891) выращивали в соответствии со спецификацией Американской коллекции типовых культур при минимальном возможном количестве пересевов. Выращивали и поддерживали клетки в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и инкубировали при 37 °C в 5% CO₂. Собирали клетки из колб с помощью TryPLE, дважды промывали в DPBS, повторно суспендировали в HBSS и смешивали с матрицей базальной мембраны BD Biosciences (MATRIGEL®), чтобы достичь в клеточной суспензии отношения клеток к матрице 1:1, с получением объема для инокуляции 0,2 мл клеток в матричной суспензии, содержащей 5e⁶ клеток. В течение процедуры инокуляции клеточные суспензии выдерживали на льду, и начинали имплантацию в течение одного часа после сбора клеточной культуры. Имплантаты вводили подкожно в правый задний бок самок мышей CB17 SCID, приобретенных у компании Harlan (18-20 г). Мышей кормили ad libitum кормом Harlan Teklad Protein Extruded 2920X и обеспечивали доступ к воде в подвесной поилке. Обеспечивали возможность роста

имплантированных опухолевых клеток до солидных опухолей и дважды в неделю измеряли вместе с массой тела, начиная с седьмого дня после имплантации. Объем опухоли определяли по уравнению: $0,536 * L * W^2$. По достижении объема опухоли около 150-200 мм³, животных рандомизировали и распределяли на группы, содержащие по 5-8 животных. Исследуемые соединения составляли в композиции в 1% растворе носителя ГЭЦ, содержащем 0,25% Tween 80 и 0,05% противопенного агента с 1,1 мол. экв. метансульфоновой кислоты для *in situ* образования соли (1,1 мл 1 н. раствора метансульфоновой кислоты на (вставьте молекулярную массу) мг соединения). Хранили исследуемое соединение при комнатной температуре. Один раз в неделю составляли композиции соединения и хранили при комнатной температуре. В контрольную группу, которую лечили носителем, кислоту не добавляли. Дозы рассчитывали на основании последних данных измерения средней массы в группе. Вводили соединения через ротовой зонд в течение 28 дней по схеме BID (два раза в сутки) или QD (один раз в сутки), в зависимости от дозы.

Соединение, входящее в границы объема настоящего изобретения, испытывали в указанном анализе, по существу, так, как описано выше. Соединение примера 1 демонстрировало ингибирование роста опухоли на 31% в дозе 30 мг/кг BID, регрессию опухоли на 22% в дозе 60 мг/кг BID и регрессию опухоли 22% в дозе 120 мг/кг QD. Полученные результаты демонстрируют, что соединение примера 1 приводит к регрессии опухоли в модели ксенотрансплантата опухоли HCC827.

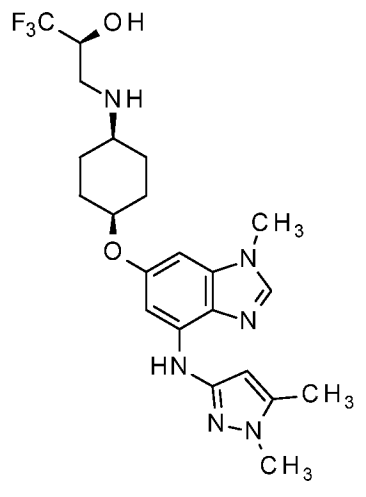
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы I:

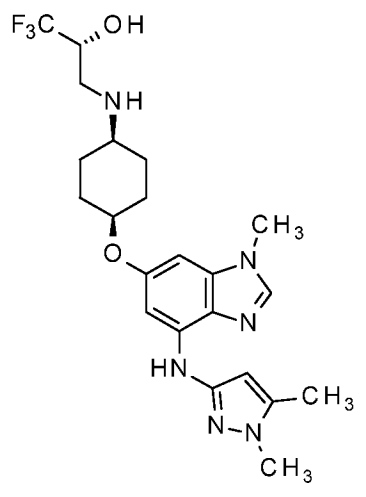


или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, выбранное из группы, состоящей из:

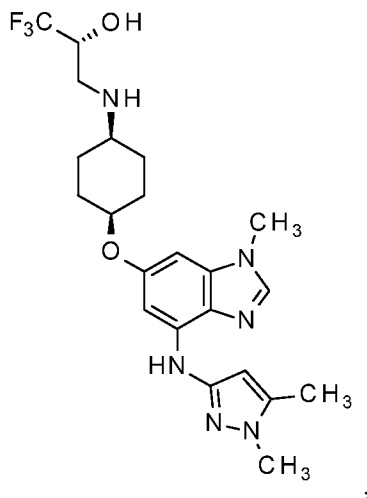


или его фармацевтически приемлемой соли, и



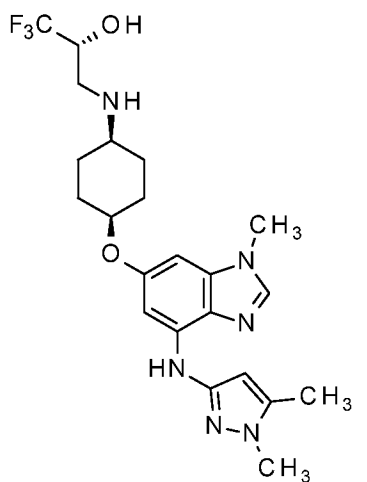
или его фармацевтически приемлемой соли.

3. Соединение по п. 2, представляющее собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п. 2, представляющее собой



5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или соль по любому из пп. 1-4 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

6. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения или соли по любому из пп. 1-4.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого и аденокарциному легкого, аденокарциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, включая гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии, колоректального рака, рака молочной железы и лейкоза, включая острый лимфоцитарный лейкоз.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что рак представляет собой аденокарциному легкого.

10. Способ по п. 7, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

11. Способ по п. 7, отличающийся тем, что рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии.

12. Соединение или соль по любому из пп. 1-4 для применения в терапии.

13. Соединение или соль по любому из пп. 1-4 для применения при лечении рака.

14. Соединение или соль для применения по п. 13, отличающиеся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого и аденокарциному легкого, аденокарциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, включая гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии, колоректального рака, рака молочной железы и лейкоза, включая острый лимфоцитарный лейкоз.

15. Соединение или соль для применения по п. 14, отличающиеся тем, что рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

16. Соединение или соль для применения по п. 14, отличающиеся тем, что рак представляет собой аденокарциному легкого.

17. Соединение или соль для применения по п. 14, отличающиеся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

18. Соединение или соль для применения по п. 14, отличающиеся тем, что рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному жителей Азии.