

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044974**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.18**

(21) Номер заявки  
**202190748**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.09.10**

(51) Int. Cl. *A61K 31/4725* (2006.01)  
*A61K 31/506* (2006.01)  
*A61K 31/519* (2006.01)

---

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ИНГИБИТОРОМ ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗЫ С ЦИНКСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ГРУППИРОВКОЙ**

---

(31) **62/729,648**

(32) **2018.09.11**

(33) **US**

(43) **2021.07.22**

(86) **PCT/US2019/050373**

(87) **WO 2020/055840 2020.03.19**

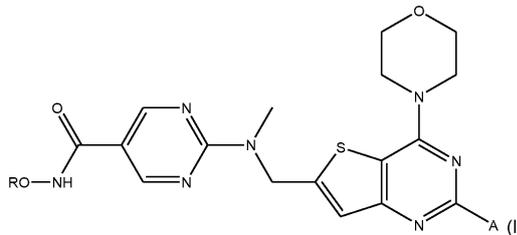
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КБЮРИС ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ван Цзин, Паттерсон Трой Дэвид,  
Тянь Цзэ (US)**

(74) Представитель:  
**Гизатуллина Е.М. (RU)**

(56) US-A1-20170362251  
US-A1-20120039906  
US-B2-8461157  
WO-A1-2013019906

(57) В изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение данному субъекту: (a) соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, где R представляет собой атом водорода или ацильную группу; и (b) ингибитора передачи сигнала, опосредуемой белком 1 программируемой клеточной смерти (PD-1); при этом соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в количествах, которые в комбинации оказываются терапевтически эффективными. Согласно данному изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.



**044974**  
**B1**

**044974**  
**B1**

### Родственная заявка

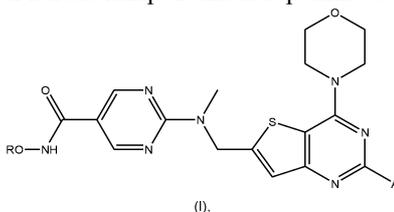
Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/729648, поданной 11 сентября 2018 г. Все идеи вышеупомянутой заявки включены в данное описание посредством ссылки.

### Предшествующий уровень техники

В терапевтические схемы для лечения злокачественных новообразований зачастую включают комбинированную терапию двумя или более агентами. В частности, для более эффективного лечения различных типов рака и ингибирования развития резистентных к терапии раковых клеток можно комбинировать методы направленно воздействующей терапии. В области разработки противораковых лекарственных средств существует потребность в особо эффективных комбинациях лекарственных средств для лечения конкретных типов рака.

### Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии соединением формулы I



или его фармацевтически приемлемой солью, где R представляет собой атом водорода или ацильную группу; ацильная группа предпочтительно представляет собой  $R_1C(O)-$ , где  $R_1$  представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{24}$ -алкил, предпочтительно  $C_1-C_{10}$ -алкил и более предпочтительно  $C_1-C_6$ -алкил; замещенный или незамещенный  $C_2-C_{24}$ -алкенил, предпочтительно  $C_2-C_{10}$ -алкенил и более предпочтительно  $C_2-C_6$ -алкенил; замещенный или незамещенный  $C_2-C_{24}$ -алкинил, предпочтительно  $C_2-C_{10}$ -алкинил и более предпочтительно  $C_2-C_6$ -алкинил; замещенный или незамещенный арил, предпочтительно замещенный или незамещенный фенил; либо замещенный или незамещенный гетероарил, и A представляет собой возможно замещенный фенил, возможно замещенный пиридил или возможно замещенный пиримидил; и ингибитором передачи сигнала, опосредуемой белком 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), для лечения раковых заболеваний. Например, в одном из воплощений изобретения предложен способ предупреждения или лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Данный способ включает введение субъекту соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала, при этом соединение формулы I и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в количествах, которые в комбинации оказываются терапевтически эффективными. Предпочтительно соединение формулы I или его соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту в количествах, которые обеспечивают синергический эффект.

Кроме того, данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с ингибитором PD-1-опосредуемой передачи сигнала и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Соединения формулы I и, в частности, соединение формулы I, где R представляет собой атом водорода, и A представляет собой 2-метокси-5-пиридил, также обозначаются в данном описании как соединение 1, имеют предпочтительные свойства для применения в качестве терапевтических агентов, как например, для лечения раковых и других заболеваний и расстройств, ассоциированных с активностью фосфоинозитид-3(PI3)-киназы и/или гистондеацетилазы (HDAC). Соединение 1, например, обладает мощной ингибирующей активностью в отношении таких молекулярных мишеней, как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) и HDAC, и мощной антипролиферативной активностью в отношении ряда линий раковых клеток *in vitro*. Соединение 1 имеет значительную пероральную биодоступность, что наблюдали в животных моделях. После или перорального, или внутривенного введения мышам, несущим опухолевые ксенотрансплантаты, продемонстрировано значительное поглощение соединения опухолевой тканью и показана его фармакодинамическая активность в опухолевой ткани. Соединение 1 также проявляет значительную противоопухолевую активность в мышинных моделях опухолевых ксенотрансплантатов после или перорального, или внутривенного введения. Кроме того, соединение имеет благоприятный профиль безопасности, что показано, например, при тестировании генотоксичности с использованием теста Эймса.

### Краткое описание графических материалов

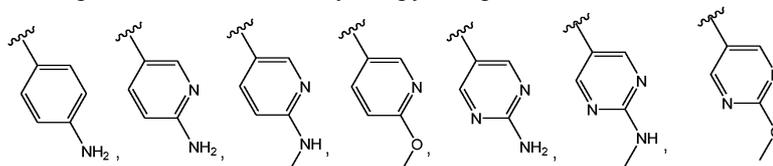
Вышеупомянутые и другие цели, признаки и преимущества данного изобретения будут очевидны из следующего далее более конкретного описания предпочтительных воплощений изобретения, как проиллюстрировано на прилагаемых графических материалах.

На фиг. 1 представлен график зависимости объема опухоли от времени в мышинной модели ксенотрансплантата CT26.WT, как описано в примере 11.

На фиг. 2 представлен график зависимости объема опухоли от времени в мышинной модели ксенотрансплантата A20, как описано в примере 12.

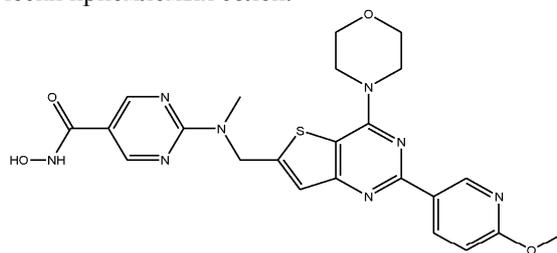
### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для комбинированной терапии рака, содержащим соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала. В предпочтительном воплощении соединений формулы I, А представляет собой фенил, пиридил или пиримидил, замещенный группой метокси, amino или N-метиламино. Более предпочтительно А представляет собой одну из групп, приведенных ниже.

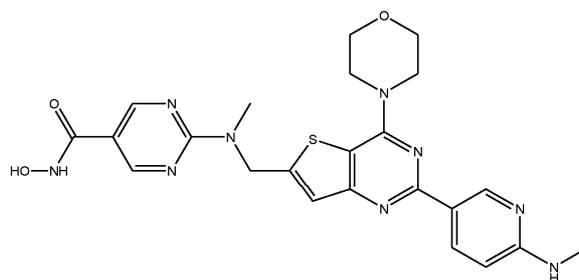


В некоторых воплощениях соединений формулы I А представляет собой одну из групп, показанных выше, и R представляет собой атом водорода.

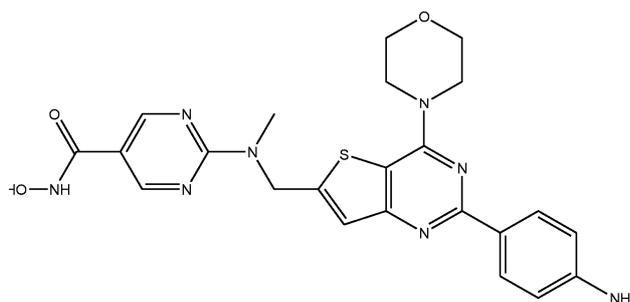
В предпочтительном воплощении соединение формулы I выбрано из соединений 1, 2 и 3, приведенных ниже, и их фармацевтически приемлемых солей.



Соединение 1



Соединение 2



Соединение 3.

Согласно изобретению предложен способ предупреждения или лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает стадию введения субъекту соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала, при этом соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в количествах, которые в комбинации оказываются терапевтически эффективными.

Ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала может представлять собой любое соединение, которое ингибирует PD-1-опосредованную передачу сигнала. Например, ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала может ингибировать PD-1 и/или активирующий лиганд (L) PD-1, такой как PD-L1 или PD-L2. Ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала может представлять собой малую молекулу, полинуклеотид или белок, такой как антитело. Предпочтительно ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой моноклональное антитело, более предпочтительно гуманизованное или полностью человеческое моноклональное антитело. В одном из воплощений ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой моноклональное антитело к PD-1. В другом воплощении ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой моноклональное антитело к PD-L1. В другом воплощении ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой мо-

ноклональное антитело к PD-L2. Подходящие ингибиторы PD-1-опосредуемой передачи сигнала включают, но не ограничиваются этим, ингибиторы, описанные в US 8008449, WO 2006/121168, WO 2009/114335, US 8354509, US 8609089, US 2010/0028330, US 2012/0114649, WO 2007/005874, WO 2010/077634, US 7943743, US 2012/0039906 и WO/2011/066342, все они включены в данное описание во всей своей полноте. Примеры подходящих ингибиторов PD-1-опосредуемой передачи сигнала включают YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, MDX-1105 и AMP-224. Предпочтительные ингибиторы PD-1-опосредуемой передачи сигнала включают пембролизумаб (KEYTRUDA™), ниволумаб (OPDIVO™), ателолизумаб (TECENTRIQ™), авелумаб (BAVENCIO™), дурвалумаб (IMFINZI™) и пидилизумаб.

В особо предпочтительных воплощениях способов и композиций по изобретению соединение формулы I представляет собой соединение 1.

В особо предпочтительных воплощениях изобретения ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

В некоторых воплощениях способа по изобретению соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту одновременно в виде отдельных композиций. В некоторых воплощениях соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту совместно посредством одних и тех же или разных путей введения.

В некоторых воплощениях соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту последовательно в виде отдельных композиций. В некоторых воплощениях соединение формулы I и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту последовательно посредством одних и тех же или разных путей введения. В одном из воплощений ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту после введения соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В другом воплощении ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту до введения субъекту соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых воплощениях, в которых соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в виде отдельных композиций, каждую композицию независимо вводят трансмукозально, перорально, ректально, вагинально, сублингвально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, трансбуккально, интраназально, интрацистернально, внутрибрюшинно или внутрь уха. В некоторых воплощениях одна или обе композиции введены в суппозитории или гидрогель. В предпочтительных воплощениях обе композиции вводят перорально.

В некоторых воплощениях, в которых соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в виде отдельных композиций, временные интервалы при их введении выбирают таким образом, чтобы проявления действия фармакологических агентов перекрывались во времени, благодаря чему достигался комбинированный терапевтический эффект. Например, соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала можно вводить последовательно с разделением по времени больше, чем примерно на 60 мин. Например, промежуток времени между последовательным введением соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала может составлять больше 60 мин, больше 2 ч, больше 5 ч, больше 10 ч, больше 1 суток, больше 2 суток, больше 3 суток или больше 1 недели. Оптимальные времена введения будут зависеть от скоростей всасывания, распределения, метаболизма и/или выведения соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала.

Сначала можно вводить либо соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, либо ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала. Например, ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала можно вводить субъекту спустя промежуток времени после введения соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В этом случае может оказаться желательным вводить ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала до момента времени, к которому субъектом будет метаболизировано или экскретировано примерно 50% (например, до момента времени, к которому субъектом будет метаболизировано или экскретировано примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5%) соединения формулы I. В другом примере субъекту вводят первую дозу соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, затем вводят разовую дозу ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала, после которой далее вводят дополнительную дозу соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых воплощениях соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в разовой лекарственной форме, которую вводят трансмукозально, перорально, ректально, вагинально, сублингвально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, трансбуккально, интраназально, интрацистернально, внутрибрюшинно или внутрь уха. Предпочтительно разовую лекарственную форму вводят перорально.

Соединение формулы I можно вводить примерно один раз в неделю, примерно один раз в сутки или

более одного раза в сутки. В одном из воплощений соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально. В другом воплощении, соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят парентерально, например, внутривенно. Соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить в суточной дозе от примерно 1 мг до примерно 1500 мг. Например, соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить в суточной дозе примерно 200 мг. В одном из воплощений соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозировке от примерно 1 мг до примерно 250 мг на один кг массы тела.

Тем не менее, будет понятно, что частота введения и общая суточная доза соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала могут быть определены для отдельного пациента специалистом в данной области техники, например, лечащим врачом, с медицинской точки зрения. Специальная(ые) доза или дозы для любого конкретного пациента будет(ут) зависеть от ряда факторов, в том числе от подвергаемого лечению расстройства и тяжести этого расстройства; активности конкретного используемого соединения; конкретной используемой композиции; возраста и массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания пациента; времени введения, пути введения и скорости выделения конкретного используемого соединения; продолжительности лечения; лекарственных средств, применяемых в комбинации или совместно с конкретным используемым соединением; и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Термин "рак" относится к любому типу рака, причиной которого является пролиферация злокачественных неопластических клеток, такому как опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкозы, лимфомы и тому подобное. Например, типы рака включают, но не ограничиваются этим, мезотелиому, лейкозы и лимфомы, такие как кожные Т-клеточные лимфомы (CTCL), некожные периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы, ассоциированные с Т-клеточным лимфотропным вирусом человека (HTLV), такие как Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых (ATLL), В-клеточную лимфому, такую как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), острые нелимфоцитарные лейкозы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, лимфомы и множественную миелому, неходжкинскую лимфому, острый лимфолейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML) или гепатоклеточную карциному. Другие примеры включают миелодиспластический синдром, солидные опухоли у детей, такие как опухоли головного мозга, нейробластома, ретинобластома, опухоль Вильмса, опухоли кости и саркомы мягких тканей, обычные солидные опухоли у взрослых, такие как раковые заболевания области головы и шеи (например, рак полости рта, гортани, носоглотки и пищевода), раковые заболевания мочеполовой системы (например, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, матки, яичников, яичек), рак легкого (например, мелкоклеточный и немелкоклеточный), рак молочной железы, рак поджелудочной железы, меланому и другие типы рака кожи, рак желудка, опухоли головного мозга, опухоли, связанные с синдромом Горлина (например, медуллобластома, менингиома и т.д.) и рак печени. Дополнительные типичные формы рака, которые могут быть подвергнуты лечению соединениями, являющимися предметом изобретения, включают, но не ограничиваются этим, рак скелетных или гладких мышц, рак желудка, рак тонкого кишечника, карциному прямой кишки, рак слюнной железы, рак эндометрия, рак надпочечников, рак анального канала, рак прямой кишки, рак паращитовидной железы и рак гипофиза.

Дополнительными видами рака, для предупреждения, лечения и изучения которых могут быть использованы соединения, описанные в данной заявке, являются, например, карцинома толстой кишки, карцинома на фоне семейного аденоматозного полипоза и наследственный неполипозный колоректальный рак или меланома. Кроме того, раковые заболевания включают, но не ограничиваются этим, рак губы, рак гортани, рак гортаноглотки, рак языка, рак слюнных желез, карциному желудка, аденокарциному, рак щитовидной железы (медулярный и папиллярный рак щитовидной железы), карциному почки, рак паренхимы почки, рак шейки матки, рак тела матки, рак эндометрия, хориокарциному, рак яичка, рак мочевыводящих путей, меланому, опухоли головного мозга, такие как глиобластома, астроцитомы, менингиома, медуллобластома и периферические нейроэктодермальные опухоли, рак желчного пузыря, рак бронхов, множественную миелому, базалиому, тератому, ретинобластома, меланому хориоидеи, семиному, рабдомиосаркому, кран иофарингиому, остеосаркому, хондросаркому, миосаркому, липосаркому, фибросаркому, саркому Юинга и плазмоцитому. Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложено применение одного или более соединений по изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

В одном из воплощений подлежащий лечению рак представляет собой гемобластоз. Гемобластозы включают лейкозы, лимфомы и множественную миелому. Примеры включают лимфоцитарные лейкозы, такие как острый лимфоцитарный лейкоз, в том числе острый лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток, острый лимфобластный лейкоз из предшественников Т-клеток, лейкоз Беркитта и острый бифенотипический лейкоз; и хронический лимфоцитарный лейкоз, в том числе В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; и миелогенные лейкозы, такие как острый миелогенный лейкоз, в том числе острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз; и хронический миелогенный лейкоз, в том числе хронический моноцитарный лейкоз; острый моноцитарный

лейкоз. Другие лейкозы включают волосатоклеточный лейкоз; Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лейкоз из крупных гранулярных лимфоцитов; и Т-клеточный лейкоз взрослых.

Лимфомы включают лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, в том числе В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфомы натуральных клеток-киллеров (NK-клеточная лимфома) клеток и новообразования из лимфоидных клеток-предшественников. В-Клеточные лимфомы включают лимфому/лейкоз Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, В-клеточный(ую) хронический(ую) лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфому, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмоцитарную лимфому (такую как макроглобулинемия Вальденстрема), лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки, волосатоклеточный лейкоз, плазмноклеточную опухоль, плазмноклеточную миелому (также известную как множественная миелома), плазмацитому, отложение моноклональных иммуноглобулинов, болезнь тяжелых цепей, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, также называемую лимфомой, возникающей из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT, от англ. lymphoma originating from mucosa-associated lymphoid tissue), нодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, первичную кожную лимфому из клеток центра фолликула, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфогранулематоз, первичную крупноклеточную В-клеточную лимфому средостения (тимуса), внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, ALK (киназа анапластической лимфомы) плюс крупноклеточную В-клеточную лимфому, плазмобластную лимфому, первичную лимфому серозных полостей и крупноклеточную В-клеточную лимфому, возникающую в результате ассоциированной с вирусом герпеса человека 8 типа (HHV8) многоочаговой болезни Каслмана.

Т-клеточные и NK-клеточные лимфомы включают кожную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз из крупных гранулярных лимфоцитов, агрессивный NK-клеточный лейкоз, Т-клеточный лейкоз/Т-клеточную лимфому взрослых, экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому назального типа, Т-клеточную лимфому типа энтеропатии, гепатолиенальную Т-клеточную лимфому, бластную NK-клеточную лимфому, грибовидный микоз/синдром Сезари, первичные кожные CD30-положительные по кластеру дифференцировки 30 (CD30) Т-клеточные лимфолиферативные нарушения, такие как первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфоматоидный папулез, лимфому из клеток с иммунофенотипом периферических Т-клеток, никак не уточненную, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому и анапластическую крупноклеточную лимфому.

В предпочтительных воплощениях подлежащий лечению рак представляет собой неходжкинскую лимфому и, более предпочтительно, В-клеточную лимфому. В особо предпочтительных воплощениях подлежащий лечению рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), например, DLBCL подтипа с активированными В-клетками (ABC), DLBCL подтипа с В-клетками зародышевого центра (GCB), "double-hit" лимфома DLBCL или "double-expresser" лимфома DLBCL (Quintanilla-Martinez, L, Hematol. Oncol., 2015, 33: 50-55). В некоторых воплощениях рак представляет собой рецидивирующую или плохо поддающуюся лечению DLBCL.

В одном из воплощений настоящего изобретения предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного средства для лечения рака в комбинации с ингибитором PD-1-опосредуемой передачи сигнала. В другом воплощении настоящего изобретения предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала в изготовлении лекарственного средства для лечения рака. В предпочтительном воплощении соединение формулы I представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, а ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

Кроме того, изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала. В одном из воплощений соединение формулы I представляет собой соединение 1, соединение 2 или соединение 3, а ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

Соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала можно вводить любым подходящим способом, включая, без ограничения, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, путем имплантации, пероральный, сублингвальный, трансбуккальный, назальный, легочный, трансдермальный, местный, вагинальный, ректальный и трансмукозальный способы введения или тому подобное. Местное введение также может включать применение трансдермального введения, как например, трансдермальные пластыри или устройства для ионофореза. Фармацевтические препараты включают препарат в твердой, полутвердой или жидкой форме (таблетку, шарик, лепешку, капсулу, суппозиторий, крем, мазь, аэрозоль, порошок, жидкость, эмульсию, суспензию, сироп, инъекцию и т.д.), содержащий соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала или обе эти составляющие, которые подходят для выбранного способа введения. В одном из воплощений фармацевтические композиции вводят перорально, и поэтому их готовят в форме, подходящей для перорального ве-

дения, т.е. в виде препарата в твердой или жидкой форме. Подходящие твердые пероральные составы включают таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, шарики, саше и шипучие формы, порошки и тому подобное. Подходящие жидкие пероральные составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и тому подобное. В одном из воплощений настоящего изобретения композицию готовят в виде капсулы. Согласно этому воплощению композиции по настоящему изобретению содержат помимо активного соединения и инертного носителя или разбавителя, твердую желатиновую капсулу.

В составах по настоящему изобретению может быть использован любой инертный эксципиент, который обычно используется в качестве носителя или разбавителя, такой как, например, камедь, крахмал, сахар, вещество на основе целлюлозы, акрилат или их смеси. Предпочтительным разбавителем является микрокристаллическая целлюлоза. Композиции могут дополнительно содержать разрыхлитель (например, натриевую соль кроскармелозы) и смазывающее вещество (например, стеарат магния), и помимо этого могут содержать одно или более чем одно вспомогательное вещество, выбранное из связующего вещества, буфера, ингибитора протеаз, поверхностно-активного вещества, солюбилизующего агента, пластификатора, эмульгатора, стабилизирующего агента, повышающего вязкость агента, подсластителя, пленкообразующего агента или любой их комбинации. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут быть в форме составов с контролируемым высвобождением или с немедленным высвобождением.

В случае жидких составов фармацевтически приемлемыми носителями могут быть водные или неводные растворы, суспензии, эмульсии или масла. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и забуференные среды. Примерами масел являются масла из нефти, а также животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, оливковое масло, подсолнечное масло и рыбий жир. Растворы или суспензии также могут включать следующие компоненты:

стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, например, на основе ацетата, цитрата или фосфата, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH может быть подведено с использованием кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия.

Кроме того, композиции могут дополнительно содержать связующие вещества (например, аравийскую камедь, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), разрыхлители (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, натриевую соль кроскармелозы, кросповидон, гуаровую камедь, натрия крахмала гликолят, примойел), буферы (например, на основе трис-HCl, ацетата, фосфата) с разными значениями pH и ионной силы, вспомогательные вещества, такие как альбумин или желатин для предотвращения всасывания на поверхностях, детергенты (например, твин 20, Твин 80, плуроник F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеаз, поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилитель проницаемости, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтилен глицерина, полиэтиленгликоль), глидант (например, коллоидный диоксид кремния), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), повышающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, сахарозу, аспартам, лимонную кислоту), ароматизаторы (например, ароматизатор с привкусом мяты перечной, метилсалицилат или ароматизатор с привкусом апельсина), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), смазывающие вещества (например, стеариновую кислоту, стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), агенты для повышения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия), полимерные покрытия (например, полоксамеры или полоксамины, покрывающие и пленкообразующие агенты (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

В одном из воплощений для приготовления препаратов на основе активных соединений используют носители, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, таких как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту. Способы приготовления таких составов будут очевидны специалистам в данной области техники. Данные материалы также могут быть получены из коммерческих источников Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также могут быть использованы суспензии липосом. Они могут быть приготовлены согласно способам, известным специалистам в

данной области техники, например так, как описано в патенте США № 4522811.

Особое преимущество заключается в приготовлении пероральных композиций в стандартной лекарственной форме для облегчения введения и достижения единообразия дозировки. Термин "стандартная лекарственная форма", использованный в данном описании, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унитарных дозировок для подлежащего лечению субъекта; при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное на достижение желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм по изобретению продиктована с учетом и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также ограничений, присущих области приготовления препаратов на основе такого активного соединения, с точки зрения лечения индивидов.

Составы по изобретению, предназначенные для перорального введения, могут включать один или более чем один усилитель проницаемости, включая длинноцепочечные жирные кислоты или их соли, такие как декановая кислота и деканоат натрия.

В одном из предпочтительных воплощений на основе данного соединения может быть приготовлена композиция в водном растворе для внутривенной инъекции. В одном из воплощений могут быть соответственно использованы солюбилизирующие агенты. Особенно предпочтительный солюбилизирующий агент включает циклодекстрины и модифицированные циклодекстрины, такие как производное  $\beta$ -циклодекстрина с замещением сульфоновой кислотой или его соль, в том числе модифицированный сульфобутилом  $\beta$ -циклодекстрин, такой как сульфобутиловый эфир 7- $\beta$ -циклодекстрина, который продается фирмой CyDex, Inc. под торговым названием CAPTISOL®.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями для введения.

Ежесуточное введение можно повторять непрерывно в течение периода времени от нескольких суток до нескольких лет. Лечение путем перорального введения может продолжаться в течение периода времени от одной недели до конца жизни пациента. Предпочтительно введение может происходить в течение пяти последовательных суток, после чего можно провести оценку состояния пациента с целью определения необходимости дальнейшего введения. Введение может быть непрерывным или периодическим, например, проводят курс лечения в течение нескольких дней подряд, после чего следует период отдыха. Соединения по настоящему изобретению можно вводить внутривенно в первые сутки лечения, с пероральным введением во вторые сутки и все последующие дни после этого.

Способ приготовления фармацевтических композиций, которые содержат активный компонент, хорошо известен в данной области техники, например, это способы, осуществляемые путем смешивания, гранулирования или формования таблеток. Активный терапевтический ингредиент зачастую смешивают с эксципиентами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. В случае перорального введения активные агенты смешивают со вспомогательными веществами, общепризнанно применяемыми для этой цели, такими как разбавители, стабилизаторы или инертные разбавители, и преобразуют общепринятыми методами в формы, подходящие для введения, такие как таблетки, таблетки, покрытые оболочкой, твердые или мягкие желатиновые капсулы, водные, спиртовые или масляные растворы и тому подобное, которые подробно описаны выше.

Количество соединения, вводимого пациенту, должно быть меньше количества, которое могло бы быть причиной токсичности у пациента. В некоторых воплощениях количество соединения, которое вводят пациенту, меньше количества, которое приводит к достижению концентрации соединения в плазме крови пациента, равной или превышающей уровень токсичности соединения. Предпочтительно, чтобы концентрация соединения в плазме крови пациента сохранялась на уровне примерно 10 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 25 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 50 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 100 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 500 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 1000 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 2500 нМ. В одном из воплощений концентрация соединения в плазме крови пациента сохраняется на уровне примерно 5000 нМ. Оптимальное количество соединения, которое следует вводить пациенту при практическом применении настоящего изобретения, будет зависеть от конкретного используемого соединения и типа подвергаемого лечению рака.

#### **Определения**

Ниже перечислены определения различных терминов, использованных для описания данного изобретения. Эти определения применяются к терминам в том виде, в котором они используются по всему этому описанию и в формуле изобретения, если иное не ограничено в специальных случаях, либо независимо, либо как часть большей группы.

Термин "ацил" относится к атому водорода, алкилу, частично насыщенному или полностью насыщенному циклоалкилу, частично насыщенному или полностью насыщенному гетероциклу, арил- и гетероарилзамещенным карбонильным группам. Например, ацил включает такие группы, как (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алканоил (например, формил, ацетил, пропионил, бутирил, валерил, капроил, трет-бутилацетил и т.д.), (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)циклоалкилкарбонил (например, циклопропилкарбонил, циклобутилкарбонил, циклопентилкарбонил, циклогексилкарбонил и т.д.), гетероциклический карбонил (например, пирролидинилкарбонил, пирролид-2-он-5-карбонил, пиперидинилкарбонил, пиперазинилкарбонил, тетрагидрофуранилкарбонил и т.д.), ароил (например, бензоил) и гетероароил (например, тиофенил-2-карбонил, тиофенил-3-карбонил, фуранил-2-карбонил, фуранил-3-карбонил, 1 Н-пирроил-2-карбонил, 1 Н-пирроил-3-карбонил, бензо[b]тиофенил-2-карбонил и т.д.). Помимо этого алкильная, циклоалкильная, гетероциклическая, арильная и гетероарильная часть ацильной группы может представлять собой одну из групп, описанных в соответствующих определениях. Если указан термин "возможно замещенный", то ацильная группа может незамещенной или возможно замещенной одним или более заместителями (обычно одним-тремя заместителями), независимо выбранными из группы заместителей, перечисленных ниже в определении для термина "замещенный", или алкильная, циклоалкильная, гетероциклическая, арильная и гетероарильная часть ацильной группы может быть замещена так, как описано выше в предпочтительном и более предпочтительном списке заместителей, соответственно.

Термин "алкил" включает в себя линейные или разветвленные радикалы, имеющие от одного до примерно двадцати атомов углерода или, предпочтительно, от одного до примерно двенадцати атомов углерода. Более предпочтительными алкильными радикалами являются "низшие алкильные" радикалы, имеющие от одного до примерно десяти атомов углерода. Наиболее предпочтительны низшие алкильные радикалы, имеющие от одного до примерно восьми атомов углерода. Примеры таких радикалов включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изоамил, гексил и тому подобное.

Термин "алкенил" включает в себя линейные или разветвленные радикалы, имеющие по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, состоящие из от двух до примерно двадцати атомов углерода или, предпочтительно, от двух до примерно двенадцати атомов углерода. Более предпочтительными алкенильными радикалами являются "низшие алкенильные" радикалы, имеющие от двух до примерно десяти атомов углерода и, более предпочтительно, от примерно двух до примерно восьми атомов углерода. Примеры алкенильных радикалов включают этенил, аллил, пропенил, бутенил и 4-метилбутенил. Термины "алкенил" и "низший алкенил" включают в себя радикалы, имеющие "цис"- и "транс"- ориентации или, альтернативно, "Е"- и "Z"-ориентации.

Термин "алкинил" включает в себя линейные или разветвленные радикалы, имеющие по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь, состоящие из от двух до примерно двадцати атомов углерода или предпочтительно от двух до примерно двенадцати атомов углерода. Более предпочтительными алкинильными радикалами являются "низшие алкинильные" радикалы, имеющие от двух до примерно десяти атомов углерода и более предпочтительно от примерно двух до примерно восьми атомов углерода. Примеры алкинильных радикалов включают пропаргил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутин, 2-бутинил и 1-пентинил.

Термин "арил", по отдельности или в комбинации, означает карбоциклическую ароматическую систему, содержащую один, два или три кольца, при этом такие кольца могут быть присоединены друг к другу подвешенным образом или могут быть конденсированы. Термин "арил" включает в себя ароматические радикалы, такие как фенил, нафтил, тетрагидронафтил, индан и бифенил.

Термин "гетероарил" включает в себя ненасыщенные гетероциклические радикалы. Примеры гетероарильных радикалов включают ненасыщенную 3-6-членную, предпочтительно 5- или 6-членную гетеромоноциклическую группу, содержащую 1-4 атома азота, например пирролил, пирролинил, имидазоллил, пиразолил, пиридил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, триазолил (например, 4Н-1,2,4-триазолил, 1Н-1,2,3-триазолил, 2Н-1,2,3-триазолил и т.д.), тетразолил (например, 1Н-тетразолил, 2Н-тетразолил и т.д.) и т.д.; ненасыщенную конденсированную гетероциклическую группу, содержащую 1-5 атомов азота, например, индолил, изоиндолил, индолизинил, бензимидазолил, хинолил, изохинолил, индазолил, бензотриазолил, тетразолопиридазинил (например, тетразоло[1,5-b]пиридазинил и т.д.) и т.д.; ненасыщенную 3-6-членную, предпочтительно 5- или 6-членную, гетеромоноциклическую группу, содержащую атом кислорода, например, пиранил, фурил и т.д.; ненасыщенную 3-6-членную гетеромоноциклическую группу, содержащую атом серы, например, тиенил и т.д.; ненасыщенную 3-6-членную, предпочтительно 5- или 6-членную, гетеромоноциклическую группу, содержащую 1 или 2 атома кислорода и 1-3 атома азота, например, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил (например, 1,2,4-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил и т.д.) и т.д.; ненасыщенную конденсированную гетероциклическую группу, содержащую 1 или 2 атома кислорода и 1-3 атома азота (например, бензоксазолил, бензоксадиазолил и т.д.); ненасыщенную 3-6-членную, предпочтительно 5- или 6-членную, гетеромоноциклическую группу, содержащую 1 или 2 атома серы и 1-3 атома азота, например, тиазолил, тиадиазолил (например, 1,2,4-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил и т.д.) и т.д.; ненасыщенную конденсированную гетероциклическую группу, содержащую 1 или 2 атома серы и 1-3 атома азота (например, бен-

зотиазолил, бензотиадиазолил и т.д.) и тому подобное.

Термин "замещенный" относится к замене одного или более радикалов водорода в заданной структуре на радикал конкретного заместителя, включая, но не ограничиваясь этим: галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, тиол, алкилтио, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, амино, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминоалкиламино, гидроксид, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоновую кислоту, сульфоновую кислоту, сульфонил, фосфоновую кислоту, арильный, гетероарильный, гетероциклический и алифатический радикал. Очевидно, что заместитель может быть дополнительно замещенным.

Термин "ингибирование" в контексте неоплазии, роста опухоли или размножения опухолевых клеток может означать оценку по отсроченному появлению первичных или вторичных опухолей, замедлению развития первичных или вторичных опухолей, уменьшению возникновения первичных или вторичных опухолей, замедлению появления или уменьшению тяжести вторичных эффектов заболевания, остановке роста опухоли и регрессу опухоли, среди прочего. В исключительной ситуации полное ингибирование называется в данном описании профилактикой или химиопрофилактикой.

Термин "метастазирование", использованный в данном описании, относится к миграции раковых клеток из исходного участка опухоли через кровеносные и лимфатические сосуды с образованием раковых опухолей в других тканях. Метастазирование также представляет собой термин, используемый для обозначения вторичного рака, развивающегося в отдаленном месте.

Термин "новообразование", использованный в данном описании, относится к массе ткани, которая возникает в результате чрезмерного деления клеток. Новообразования могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми) и также могут называться опухолью. Термин "неоплазия" представляет собой патологический процесс, который приводит к образованию опухоли.

Использованный в данном описании термин "предраковый" относится к состоянию, которое не является злокачественным, но может стать злокачественным в отсутствие его лечения.

Термин "пролиферация" относится к клеткам, претерпевающим митоз.

Термин "лечение" относится к любому процессу, действию, применению, любой терапии или тому подобному, при которых млекопитающее, в том числе человек, получает медицинскую помощь с целью улучшения состояния млекопитающего, непосредственно или опосредованно.

Использованный в данном описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые с медицинской точки зрения подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции и тому подобного и в соответствии с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S.M. Berge и др. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). Соли могут быть получены *in situ* в ходе заключительного выделения и окончательной очистки соединений по изобретению или отдельно путем взаимодействия функциональной группы свободного основания с подходящей органической кислотой или неорганической кислотой. Примеры фармацевтически приемлемых нетоксичных солей присоединения кислоты включают, но не ограничиваются этим, соли по аминогруппе, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота, лактобионовая кислота или малоновая кислота, либо с использованием других методов, используемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются этим, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогоптонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, валерат соли и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобные. Другие фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, соли с нетоксичными катионами аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкилсульфонат, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, сульфат и арилсульфонат. Обнаружено, что некоторые соли, такие как основные соли натрия, калия и холина, а также соли с кислотами, например, сульфатные и метансульфонатные соли, улучшают растворимость соединений формулы I в фармацевтически приемлемых водных средах. В одном из воплощений фармацевтически приемлемая соль соединения I представляет собой холиновую соль. Предпочтительные соли соединения I включают соль натрия и соль калия. Другие

предпочтительные соли включают сульфатные и метансульфонатные соли. В частности, предпочтительными солями соединения 1 являются метансульфонатные и бензолсульфонатные соли. Особо предпочтительной солью соединения 2 является гидрохлоридная соль.

Подразумевается, что использованный в данном описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением, такие как стерильная апиrogenная вода. Подходящие носители описаны в самом последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, авторитетном справочнике в данной области, который включен в данное описание посредством ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются этим, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5%-ный раствор сывороточного альбумина человека. Кроме того, можно использовать липосомы и такие неводные разбавители, как нелетучие масла. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ общеизвестно в данной области техники. За исключением случаев, когда любая традиционная среда или любой традиционный агент несовместимы с активным соединением, предложено их применение в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Использованный в данном описании термин "предраковый" относится к состоянию, которое не является злокачественным, но может стать злокачественным в отсутствие его лечения.

Термин "субъект", использованный в данном описании, относится к животному. Предпочтительно животным является млекопитающее. Более предпочтительно млекопитающим является человек. Термин "субъект" также относится, например, к собакам, кошкам, лошадям, крупному рогатому скоту, свиньям, морским свинкам, рыбам, птицам и тому подобному.

Соединения по данному изобретению могут быть модифицированы путем добавления соответствующих функциональных групп для усиления биологических свойств в отношении селективности. Такие модификации известны в данной области техники и могут включать модификации, которые повышают проникновение биологического вещества в заданную биологическую систему (например, кровь, лимфатическую систему, центральную нервную систему), повышают пероральную доступность, повышают растворимость, что позволяет осуществлять введение путем инъекции, изменяют процесс метаболизма и изменяют скорость выведения.

#### **Фармацевтические композиции**

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат терапевтически эффективное количество соединения формулы I, такого как соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль, в комбинации с ингибитором PD-1-опосредуемой передачи сигнала, приготовленных вместе с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом.

Предпочтительно, фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент представляет собой нетоксичный инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество для составов любого типа. Некоторыми примерами материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; циклодекстрины, такие как альфа-( $\alpha$ ), бета-( $\beta$ ) и гамма-( $\gamma$ ) циклодекстрины; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; такие эксципиенты, как масло какао и воск для суппозитория; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апиrogenная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, и кроме того, в соответствии с проницаемостью разработчика рецептур в композиции также могут присутствовать другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, смазывающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть введены перорально, парентерально, посредством ингаляции распылением, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или посредством имплантированного резервуара, предпочтительно путем перорального введения или введения посредством инъекции. Фармацевтические композиции по данному изобретению могут содержать любые традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, адьюванты или разбавители. В некоторых случаях значение pH состава можно регулировать с использованием фармацевтически приемлемых кислот, оснований или буферных веществ для повышения стабильности входящего в состав соединения или формы его доставки. Термин "парентеральный", использованный в данном описании, включает в себя подкожный, внутрикожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставной, интраартериальный, интрасиновиальный, интрастеральный, интракалькальный методы инъекции или инфузии, методы инъекции или инфузии в область поражения и в интракраниальное пространство.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые

эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активных соединений жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, из проростков семян, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Помимо инертных разбавителей пероральные композиции также могут включать такие адъюванты, как увлажняющие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, корригенты и отдушки.

Препараты для инъекций, например стерильные водные или масляные суспензии для инъекций, могут быть приготовлены в соответствии с известными в данной области техники методами с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный(ую) раствор, суспензию или эмульсию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых разбавителей и растворителей, которые могут быть использованы, можно указать воду, раствор Рингера, упомянутые в фармакопее США (U.S.P.) и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно применяют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое маловязкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении препаратов для инъекций используют жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Составы для инъекций могут быть подвергнуты стерилизации, например, путем фильтрования через задерживающий бактерии фильтр или путем введения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде перед применением.

Чтобы пролонгировать эффект лекарственного средства, зачастую бывает желательно замедлить всасывание лекарственного средства, вводимого путем подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества, имеющего слабую растворимость в воде. Тогда скорость всасывания лекарственного средства будет зависеть от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и от кристаллической формы. Альтернативно, замедленное всасывание вводимой парентерально лекарственной формы достигается путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном разбавителе. Инъекционные депо-формы готовят путем формирования матриц для микроинкапсулирования лекарственного средства в биоразлагаемых полимерах, таких как полиактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственное средство/полимер и от природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения лекарственного средства может регулироваться. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Кроме того, депо-формы инъекционных составов готовят путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканью организма.

Композициями для ректального или вагинального введения предпочтительно являются суппозитории, которые могут быть приготовлены путем смешивания соединений по данному изобретению с подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела, и поэтому расплавляются в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активное соединение.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активный ингредиент смешан по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как цитрат натрия или двузамещенный фосфат кальция, и/или с: а) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; б) связующими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и аравийская камедь; в) смачивающими агентами, такими как глицерин; г) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; д) замедлителями растворения, такими как парафин; е) ускорителями всасывания, такими как четвертичные аммониевые соединения; г) увлажняющими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; з) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; и) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма также может содержать буферные агенты.

Твердые композиции подобного типа также можно применять в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, используя такие эксципиенты, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное.

Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пиллель и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области приготовления фармацевтических препаратов. Они возможно могут содержать придающие непрозрачность агенты и могут иметь такой состав, что они будут высвобождать активный(ые) ингредиент(ы) только, или предпочтительно, в определенном отделе желудочно-кишечного тракта, возможно с задержкой. Примеры герметизирующих составов, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения по данному изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингалируемые средства и пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми необходимыми консервантами или буферными веществами, которые могут потребоваться. Офтальмический состав, ушные капли, глазные мази, порошки и растворы также охвачены, поскольку находятся в объеме данного изобретения.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, помимо активного соединения по данному изобретению, такие эксципиенты, как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать, помимо соединений по данному изобретению, такие эксципиенты, как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошкообразный полиамид или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать общепринятые пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество в обеспечении регулируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть приготовлены путем растворения или диспергирования соединения в подходящей среде. Кроме того, для увеличения поступления соединения через кожу можно использовать усилители всасывания. Скорость можно регулировать либо путем обеспечения регулирующей скоростью мембраной, либо путем диспергирования активного соединения в полимерной матрице или геле.

Для доставки в легкие терапевтическую композицию по изобретению готовят и вводят пациенту в виде частиц в твердой или жидкой форме путем непосредственного введения (например, путем ингаляции в дыхательную систему). Содержащие активное соединение частицы в твердой или жидкой форме, приготовленные для практического применения данного изобретения, включают частицы пригодного для вдыхания размера: то есть частицы достаточно малого размера, чтобы проходить через рот и гортань при вдыхании в бронхи и альвеолы легких. Доставка аэрозольных терапевтических средств, особенно аэрозольных антибиотиков, известна в данной области (см., например, патент США № 5767068 Van De vanter и др., патент США № 5508269 Smith и др., и заявку WO 98/43650, поданную Montgomery, все они включены в данное описание посредством ссылки). Обсуждение легочной доставки антибиотиков также можно найти в патенте США № 6014969, включенном в данное описание посредством ссылки.

Под "терапевтически эффективным количеством" комбинации соединения формулы I и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала понимают количество каждого соединения, которое в комбинации оказывает терапевтический эффект на подвергаемого лечению субъекта с разумным соотношением польза/риск, приемлемым для любого терапевтического лечения. Терапевтический эффект может быть оценен как объективный (т.е. который можно измерить с применением некоторого теста или маркера) или субъективный (т.е. когда субъект показывает наличие эффекта или ощущает его). Кроме того, эффективные дозы будут варьировать в зависимости от пути введения, а также возможности совместного применения с другими агентами. Тем не менее, будет понятно, что общий суточный прием соединений и композиций по настоящему изобретению будет определен лечащим врачом с медицинской точки зрения. Специальный терапевтически эффективный уровень доз для любого конкретного пациента будет зависеть от ряда факторов, в том числе от подвергаемого лечению расстройства и тяжести этого расстройства; активности конкретного используемого соединения; конкретной используемой композиции; возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания пациента; продолжительности введения, пути введения и скорости выделения конкретного используемого соединения; продолжительности лечения; лекарственных средств, применяемых в комбинации или продолжительности лечения; лекарственных средств, применяемых в комбинации или одновременно с конкретным используемым соединением; и подобных факторов, хорошо известных в области медицины. В предпочтительных воплощениях терапевтически эффективное количество комбинации соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PD-1-опосредуемой передачи сигнала, проявляет синергизм в отношении того типа рака, который подлежит лечению.

Общая суточная доза каждого соединения в случае комбинированной терапии по данному изобретению, вводимого человеку или другому животному в однократных или в разделенных дозах, может составлять, например, от 0,01 до 50 мг/кг массы тела или, в более обычном случае, от 0,1 до 25 мг/кг массы тела. Композиции в разовой дозе могут содержать такие количества или их количества в долях, которые составляют суточную дозу. В общем случае схемы лечения по настоящему изобретению включают вве-

дение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, от примерно 10 до примерно 1000 мг соединения(ий) по данному изобретению в сутки в однократных или многократных дозах.

Каждое соединение в случае комбинированной терапии по изобретению может быть, например, введено путем инъекции, внутривенно, интраартериально, субдермально, внутривентриально, внутримышечно или подкожно; либо перорально, трансбуккально, назально, трансмукозально, местно, в составе офтальмического препарата или посредством ингаляции, при этом дозировка изменяется в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 500 мг/кг массы тела, альтернативно, дозировки от 1 до 1000 мг/доза, каждые 4-120 ч или в соответствии с указаниями в отношении конкретного лекарственного средства. Способы по данному изобретению предполагают введение эффективного количества соединения или содержащей соединение композиции для достижения желаемого или указанного эффекта. Обычно фармацевтические композиции по данному изобретению будут введены от примерно 1 до примерно 6 раз в сутки или, альтернативно, в виде непрерывной инфузии. Такой режим введения можно использовать для терапии хронических или острых состояний. Количество активного ингредиента, которое может быть комбинировано с фармацевтически приемлемыми эксципиентами или носителями для приготовления разовой лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подвергаемого лечению реципиента и конкретного способа введения. Типичный препарат будет содержать от примерно 5 до примерно 95% активного соединения (мас./мас.). Альтернативно, такие препараты могут содержать от примерно 20 до примерно 80% активного соединения.

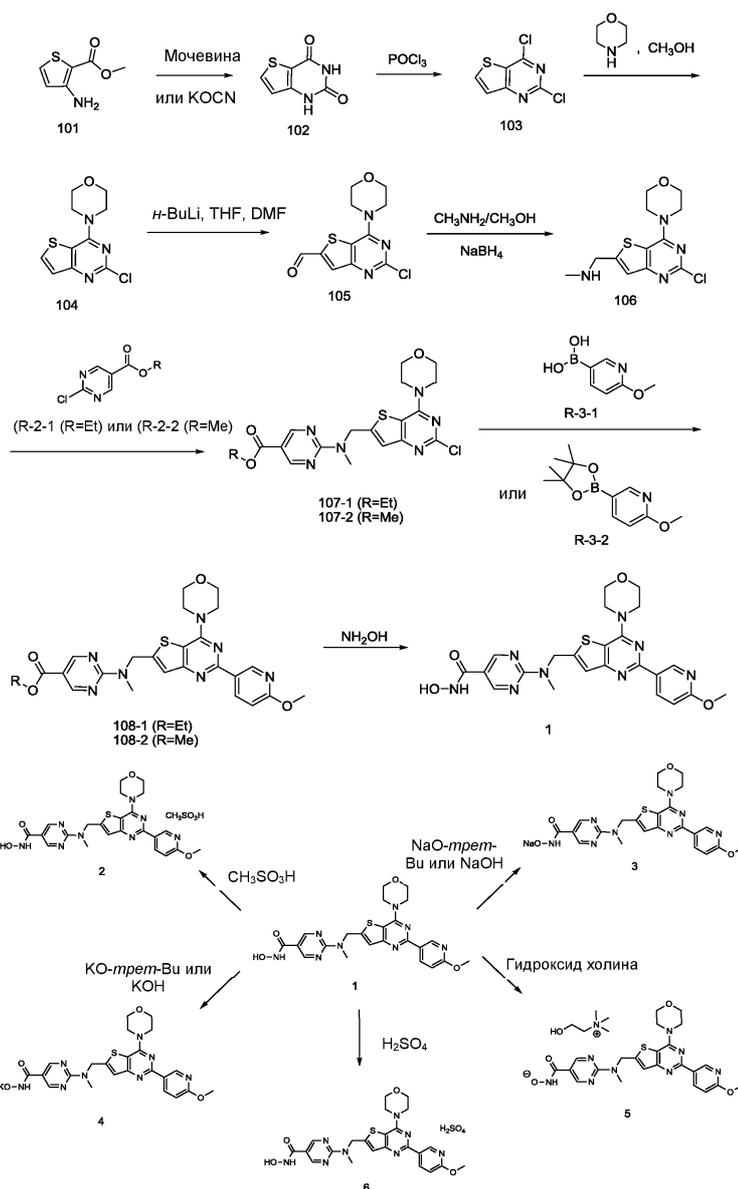
Могут быть востребованы более низкие или более высокие дозы по сравнению с перечисленными выше. Специальные схемы дозировки и лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от ряда факторов, в том числе от активности конкретного используемого соединения, возраста, массы тела, статуса общего состояния здоровья, пола, питания, времени введения, скорости выделения, комбинации лекарственных средств, тяжести и течения заболевания, состояния или симптомов, предрасположенности пациента к данному заболеванию, состоянию или симптомам и проницательности лечащего врача.

В случае улучшения состояния пациента, при необходимости можно вводить поддерживающую дозу соединения, композиции или комбинации по данному изобретению. Впоследствии дозировка или частота введения либо и то, и другое могут быть снижены в зависимости от симптомов до уровня, при котором улучшенное состояние сохраняется, когда симптомы ослабевают до желаемого уровня. Тем не менее, при повторном проявлении симптомов заболевания пациентам может потребоваться периодическое лечение на долгосрочной основе.

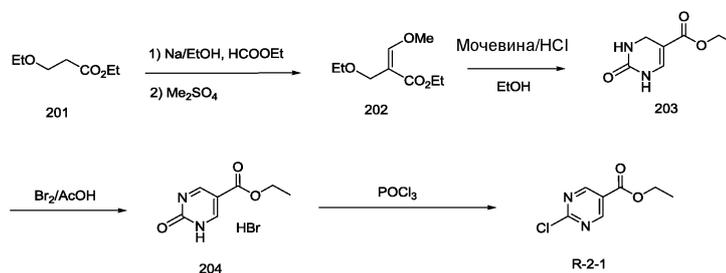
### Примеры

Соединения и способы по настоящему изобретению будут лучше поняты в сочетании со следующими далее примерами, которые предназначены только для иллюстрации, а не для ограничения объема данного изобретения. Различные изменения и модификации к раскрываемым воплощениям будут очевидны специалистам в данной области техники, и такие изменения и модификации, в том числе, без ограничения, таковые, относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, составам и/или способам по изобретению, могут быть выполнены без отклонения от сущности изобретения и объема прилагаемой формулы изобретения.

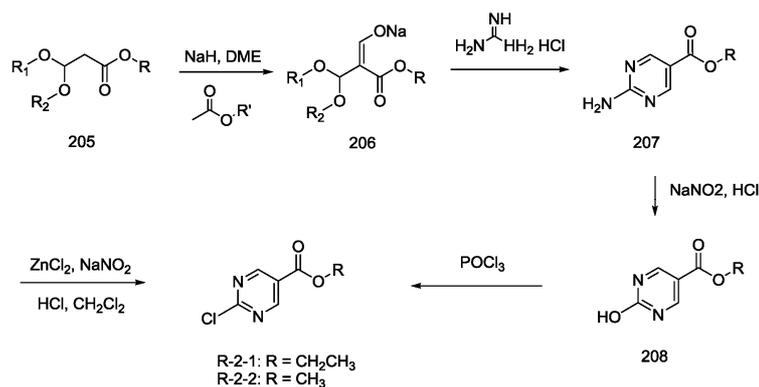
Синтез соединения 1 и его метансульфонатной, натриевой, калиевой и холиновой соли проиллюстрирован на приведенных ниже схемах.



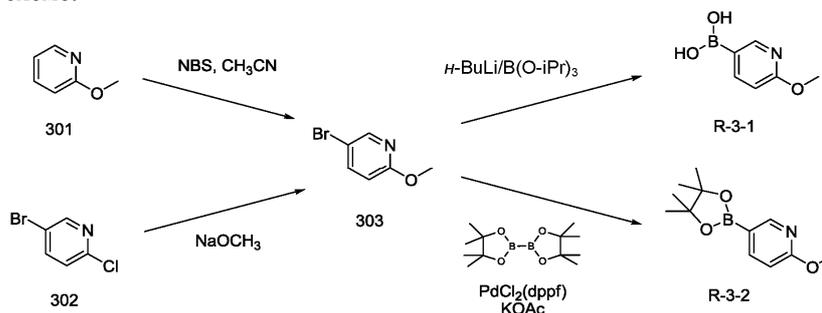
Промежуточное соединение 107-1 или 107-2 может быть получено путем взаимодействия соединения 106 либо с R-2-1, либо с R-2-2, соответственно. Схемы синтеза для получения R-2-1 и R-2-2 проиллюстрированы ниже:



или с использованием альтернативного способа:



Промежуточное соединение 108-1 и 108-2 может быть получено посредством реакции сочетания соединения 107-1 или 107-2 либо с R-3-1, либо с R-3-2, при этом R-3-1 и R-3-2 могут быть получены согласно следующей схеме:



Пример 1. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамида (соединения 1)

Стадия а: (Z)-этил-2-(этоксиметил)-3-метоксикарилат (соединение 202)

Натрий (40,9 г; 1,78 моль) осторожно порциями добавляли к этанолу (750 мл) и раствор концентрировали, получая порошок NaOEt после исчезновения всего металлического натрия. При перемешивании добавляли гексан (1,0 л) и смесь охлаждали, используя баню с ледяной водой. По каплям при 0-5°C добавляли смесь соединения 201 (130 г; 0,89 моль) и этилформиата (131 г; 1,78 моль).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. По каплям с охлаждением в бане с ледяной водой добавляли диметилсульфат (224 г; 1,78 моль). Полученную смесь нагревали при 50°C в течение 2 ч. К смеси добавляли триэтилхлорид аммония (122 г) и гидроксид натрия (20 г). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч и фильтровали. Фильтрат промывали водой и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Его концентрировали, получая указанное в заголовке соединение (140 г; 37%) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия b: этил-2-оксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоксилат (соединение 203)

Смесь соединения 202 (140 г; 0,745 моль), мочевины (40,0 г; 0,697 моль) и концентрированной соляной кислоты (34 мл) в этаноле (500 мл) нагревали при температуре дефлегмации в течение ночи. После упаривания реакционной смеси примерно до 50% объема полученную суспензию фильтровали, промывали небольшим количеством этанола и сушили, получая соединение 203 (47 г; 37%) в виде белого твердого вещества. LCMS (жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией): 171  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (ядерный магнитный резонанс) (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.19 (t, J = 7,2 Гц, 3H), 3.92 (s, 2H), 4.08 (q, J = 7,2 Гц, 2H), 7.0 (s, 1H), 7.08 (d, J = 6,0 Гц, 1H), 8.83 (d, br, J = 4,8 Гц, 1H).

Стадия с: этил-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-5-карбоксилат (соединение 204)

К раствору соединения 203 (47 г; 280 ммоль) в уксусной кислоте (500 мл) добавляли бром (49,0 г; 307 ммоль). Смесь нагревали при температуре дефлегмации в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, далее охлаждали при 0-5°C и фильтровали, получая указанное в заголовке соединение 204 в виде желтого твердого вещества (38 г; 54%). LCMS: 169  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.28 (t, J = 7,2 Гц, 3H), 4.32 (q, J = 7,2 Гц, 2H), 9.00 (br, s, 2H).

Стадия d: этил-2-хлорпиримидин-5-карбоксилат (соединение R-2-1)

Смесь соединения 204 (38,0 г; 153 ммоль), фосфорилтрихлорида (300 мл) и N,N-диметиланилина (3 мл) нагревали при температуре дефлегмации в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Остаток осторожно гасили ледяной водой, значение pH подвели до 7-8, используя карбонат натрия, и экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали ледяной водой и рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали и очищали колоночной хроматографией (элюировали смесью EtOAc/гексаны, 10%), получая соединение R-2-1 (15 г; 52%) в виде белого твердого вещества.

LCMS: 187 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.36 (t, J = 7,5 Гц, 3H), 4.39 (q, J = 7,5 Гц, 2H), 9.08 (s, 2H).

Стадия e: натрия (Z)-2-(диметоксиметил)-3-метокси-3-оксипроп-1-ен-1-олат (соединение 206)

Смесь NaN (27 г; 60% в минеральном масле; 0,675 моль) в безводном 1,2-диметоксиэтаноле (300 мл) нагревали до 40-50°C и по каплям добавляли метил-3,3-диметоксипропионат (205) (100 г; 0,675 моль). Полученную смесь перемешивали в течение 0,5 ч и по каплям добавляли безводный метилформиат (81 г; 1,35 моль) при 40-50°C. Полученную смесь перемешивали при 40-50°C (внутренняя температура) в течение 2 ч, после чего ее охлаждали до 0°C. Реакционную смесь оставляли медленно нагреваться до 25°C и перемешивали в течение ночи. Добавляли Et<sub>2</sub>O (150 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Полученную суспензию фильтровали. Твердое вещество промывали Et<sub>2</sub>O (100 мл), собирали и сушили, получая указанное в заголовке соединение 206 (82 г; 61%) в виде беловатого твердого вещества. LCMS (m/z): 130,8 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.36 (s, 6H), 3.60 (s, 3H), 5.34 (s, 1H), 8.92 (s, 1H).

Стадия f: 2-аминопиримидин-5-карбоновой кислоты метиловый эфир (соединение 207)

К смеси гуанидина гидрохлорида (42,2 г; 0,44 моль) в диметилформамиде (DMF) (300 мл) добавляли соединение 206 (80 г; 0,40 моль). Полученную смесь нагревали при 100°C в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, после чего охлаждали. Осадок на фильтре промывали 50 мл DMF и объединенный фильтрат концентрировали, получая остаток, который суспендировали в холодном EtOH и промывали холодным EtOH (50 мл), получая соединение 207 (38 г; 61,5%) в виде желтого твердого вещества. LCMS (m/z): 154,2 [M+1]<sup>+</sup>; 195,1 [M+42]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.88 (s, 3H), 8.77 (s, 2H).

Стадия g: метил-2-хлорпиримидин-5-карбоксилат (соединение R-2-2)

Соединение 207 (7 г; 0,046 моль) добавляли к смеси концентрированной соляной кислоты (15,2 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл). После охлаждения добавляли ZnCl<sub>2</sub> (18,6 г; 0,138 моль) при 15-20°C. Смесь перемешивали при 15-20°C в течение 0,5 ч и охлаждали до 5-10°C. Порциями добавляли NaNO<sub>2</sub> (9,5 г; 0,138 моль) при поддержании внутренней температуры 5-10°C. Реакцию проводили в течение примерно 2 ч. Реакционную смесь выливали в ледяную воду (50 мл). Органический слой отделяли и водную фазу экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 мл × 2). Объединенные органические экстракты концентрировали, получая неочищенный продукт (4,2 г). Неочищенное соединение суспендировали в гексане (20 мл), нагревали при 60°C в течение 30 мин и фильтровали. Фильтрат концентрировали, получая указанное в заголовке соединение R-2-2 (3,5 г; 44,4%) в виде беловатого твердого вещества. LCMS (m/z): 214,1 [M+42]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.00 (s, 3H), 9.15 (s, 2H).

Стадия h: 5-бром-2-метоксипиридин (соединение 303)

Раствор 2-метоксипиридина (100 г; 0,92 моль), N-бромсукцинимид (NBS) (180 г; 1,0 моль) в ацетонитриле (1,0 л) перемешивали при температуре дефлегмации в течение 21 ч. TLC (тонкослойная хроматография) показала завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Собирали примерно 900 мл растворителя. Полученную суспензию фильтровали и промывали n-гексаном (примерно 400 мл). Фильтрат концентрировали снова, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт подвергали дистилляции при пониженном давлении (30°C/примерно 0,3 мм Hg (40 Па)), получая указанное в заголовке соединение в виде прозрачного масла (146 г; 84%). LCMS (m/z): 190,0 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.90 (s, 3H), 6.65 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.62 (dd, J = 8,8 Гц; 2,4 Гц, 1H), 8.19 (s, 1H).

Стадия i: 6-метоксипиридин-3-илбороновая кислота (R-3-1)

К раствору соединения 303 (20 г; 0,11 моль) в безводном тетрагидрофуране (THF) (180 мл) по каплям добавляли n-BuLi (59 мл; 2 M раствор в THF) при -78°C, полученную смесь перемешивали в течение 1 ч. Добавляли триизопропилборат (37 мл) при -78°C, реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивать в течение ночи. TLC (гексаны/этилацетат, 5:1) показала завершение реакции. Значение pH смеси подвели до 3-4, используя 4 н. раствор HCl (90 мл). Осадок собирали фильтрованием, получая неочищенное соединение R-3-1 (21 г; 128%). Неочищенное соединение R-3-1 (21 г) растворяли в воде (200 мл) и значение pH раствора подвели до 8-9, используя концентрированный раствор аммиака, осадок собирали фильтрованием, получая чистое указанное в заголовке соединение R-3-1 в виде белого твердого вещества (11 г; 67%). LCMS (m/z): 154,1 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид(DMSO)-d<sub>6</sub>): δ 3.86 (s, 3H), 6.76 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 7.99 (dd, J = 8,4 Гц; 2,0 Гц, 1H), 8.05 (br, 2H), 8.52 (d, J = 2,0 Гц, 1H).

Стадия j: 2-метокси-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин (соединение R-3-2)

Смесь соединения 303 (55 г; 0,29 моль), 4,4,4',5,5,5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (90 г; 0,35 моль), ацетата калия (57 г; 0,58 моль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (2,2 г; 3 ммоль) в безводном диоксане (500 мл) нагревали при 108°C в атмосфере N<sub>2</sub> в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной хроматографией, элюировали смесью гекса-

ны/этилацетат, получая указанное в заголовке соединение R-3-2 (58 г; 84%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.30 (s, 12H), 3.88 (s, 3H), 6.81 (d, J = 8,0 Гц, 1H), 7.88 (dd, J = 8,0 Гц, 2.0 Гц, 1H), 8.41 (d, J = 2,0 Гц, 1H).

Стадия k: тиено[3,2-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (соединение 102)

Способ с применением мочевины: смесь метил-3-аминотиофен-2-карбоксилата (соединения 101) (90,0 г; 573 ммоль; 1,0 экв.) и мочевины (277,6 г; 4,6 моль; 8,0 экв.) нагревали при 190°C в течение 3-4 ч и охлаждали до комнатной температуры. К реакционной смеси добавляли водн. раствор NaOH (10%-ный, 800 мл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 ч твердое вещество удаляли фильтрованием. Фильтрат подкисляли до pH 3-4, используя HCl, выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая желаемый продукт, соединение 102, в виде беловатого твердого вещества (87 г; 89%). Т.пл.: 280-285°C. LCMS (m/z): 169,0 [M+1]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.92 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 8.05 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 11.0-11.5 (br, 2H).

Способ с применением цианата калия (KOCN): к смеси 3-аминотиофен-2-карбоксилата (соединения 101) (100,0 г; 636,9 ммоль; 1,0 экв.), уксусной кислоты (705 мл) и воды (600 мл) медленно добавляли раствор цианата калия (154,8 г; 1,91 моль; 3,0 экв.) в воде (326 мл) в течение периода времени 1 ч. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч, фильтровали и промывали водой (500 мл). Осадок на фильтре загружали в реактор подходящего размера и добавляли 2 М водный раствор гидроксида натрия (1,65 л), суспензию перемешивали в течение 2 ч и посредством LCMS подтверждали образование желаемого продукта. Смесь охлаждали до 10°C и добавляли 3 М водный раствор соляной кислоты (1,29 л) до pH 5,0-6,0. Суспензию фильтровали, промывали водой (700 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 50°C в течение 24 ч, получая соединение 102 (100 г; 94%) в виде беловатого твердого вещества. LCMS (m/z): 169,1 [M+1]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.92 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 8.04 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 11.14 (s, 1H), 11.51 (s, 1H).

Стадия i: 2,4-дихлортиено[3,2-d]пиримидин (соединение 103)

Оксихлорид фосфора (152 мл; 1,67 моль; 7,0 экв.) медленно добавляли к холодному раствору соединения 102 (40 г; 238 ммоль; 1,0 экв.) и N,N-диметиланилина (22.5 мл; 179 ммоль; 0,75 экв.) в ацетонитриле (250 мл), поддерживая температуру ниже 20°C. Затем смесь нагревали до 85°C и перемешивали в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до 15°C и далее медленно выливали в смесь льда и холодной воды (360 мл). Полученную суспензию фильтровали, промывали холодной водой (200 мл). Осадок на фильтре сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40°C в течение 24 ч, получая соединение 103 (40,5 г; 83%) в виде беловатого твердого вещества. Т.пл.: 245-250°C. LCMS (m/z): 205,0 [M+1]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.75 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 8.71 (d, J = 5,2 Гц, 1H).

Стадия m: 2-хлор-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин (соединение 104)

К смеси соединения 103 (34,2 г; 167 ммоль; 1,0 экв.) и метанола (500 мл) медленно добавляли морфолин (31,2 мл; 367 ммоль; 2,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Осадок собирали фильтрованием, промывали метанолом и сушили в вакууме, получая желаемый продукт, соединение 104, в виде светло-желтого твердого вещества (39 г; 91%). Т.пл.: 250-255°C. LCMS (m/z): 256,0 [M+1]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3.76 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.92 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 7.42 (d, J = 5,2 Гц, 1H), 8.32 (d, J = 5,2 Гц, 1H).

Стадия n: 2-хлор-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-карбальдегид (соединение 105)

К суспензии соединения 104 (20 г; 78,4 ммоль; 1,0 экв.) в THF (безводном; 320 мл) при -78°C медленно добавляли n-BuLi (в гексанах; 2,4 М раствор; 40,8 мл; 102 ммоль; 1,3 экв.) в атмосфере азота. Полученную суспензию оставляли нагреваться до -60°C для ее превращения в прозрачный коричневый раствор. Затем реакционную смесь снова охлаждали до -78°C и медленно добавляли DMF (безводный; 9,1 мл; 118 ммоль; 1,5 экв.). Полученный раствор перемешивали при -78°C в течение 0,5 ч, нагревали до 0°C в течение 1 ч и медленно выливали в смесь водн. раствора HCl (0,25 М; 660 мл) и ледяной воды (320 мл). Полученную суспензию перемешивали при 0-10°C в течение 0,5 ч, фильтровали, промывали холодной водой и сушили в вакууме, получая соединение 105 в виде желтого твердого вещества (22 г; 98%). Т.пл.: 260-265°C. LCMS (m/z): 284,0 [M+1]<sup>+</sup>.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3.77 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.96 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 8.30 (s, 1H), 10.21 (s, 1H).

Стадия o: (2-хлор-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидин-6-илметил)метиламин (соединение 106)

К раствору соединения 105 (20,0 г; 70,4 ммоль; 1,0 экв.) в метаноле (125 мл) добавляли раствор метиламина в метаноле (27%-ный (об./об.); 75 мл; 563,2 ммоль) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме, получая неочищенный твердый продукт, который растворяли в метаноле (550 мл) и THF (220 мл) в атмосфере азота. Порциями добавляли боргидрид натрия (8 г; 211,2 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при ком-

натной температуре в течение ночи. Реакционную смесь упаривали в вакууме и добавляли воду (300 мл). Водную смесь экстрагировали метиленхлоридом, объединенные экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали. Остаток растворяли в 6 М растворе  $\text{HCl}$  (230 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Водный раствор несколько раз промывали метиленхлоридом и значение pH подводили до 9-10, используя  $\text{NaOH}$  (4 н. раствор). Выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрованием и сушили ( $60^\circ\text{C}$ , 6 ч), получая светло-желтое твердое вещество (18 г; 85%). Т.пл.:  $240-245^\circ\text{C}$ . LCMS (m/z): 299  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.32 (s, 3H), 3.74 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.88 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.96 (s, 2H), 7.24 (s, 1H).

Стадия p(a): 2-[(2-хлор-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидин-6-илметил)метиламино]пиримидин-5-карбоновой кислоты этиловый эфир (соединение 107-1)

К смеси соединений 106 (10 г; 33,6 ммоль) и R-2-1 (6,8 г; 36,4 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400 мл) при комнатной температуре добавляли диизопропилэтиламин (220 мл; 1,26 моль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем смесь упаривали и после этого добавляли метиленхлорид (300 мл). Органическую фазу промывали водой, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в вакууме, получая остаток. К остатку добавляли этилацетат и полученную смесь перемешивали при температуре бани с ледяной водой в течение 50 мин. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием, получая указанный в заголовке продукт 107-1 в виде белого твердого вещества (10,6 г; 70%). LCMS: 449  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.30 (t, J = 7,2 Гц, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.71 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.83 (t, J = 4,8 Гц, 4H), 4.29 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 8.87 (s, 2H).

Стадия p(b): 2-[(2-хлор-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидин-6-илметил)метиламино]пиримидин-5-карбоновой кислоты метиловый эфир (соединение 107-2)

Смесь соединения 106 (25 г; 84 ммоль),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (500 мл) и R-2-2 (16 г; 92 ммоль) перемешивали при комнатной температуре. Добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA) (500 мл; 2,9 моль). Раствор перемешивали в течение ночи и упаривали. После добавления метиленхлорида (500 мл) органическую фазу промывали водой, сушили, используя  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и концентрировали в вакууме. К остатку добавляли этилацетат (200 мл) и смесь перемешивали в бане с ледяной водой в течение 50 мин. Указанный в заголовке продукт собирали в виде белого твердого вещества (29,4 г; 81%). LCMS (m/z): 435,2

$[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 3.25 (s, 3H), 3.71 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.82-3.84 (m, 7H), 5.21 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 8.87 (s, 2H).

Стадия q(a): этил-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксилат (соединение 108-1)

Способ А: смесь соединения 107-1 (12 г; 26,7 ммоль), соединения R-3-1 (4,9 г; 32 ммоль),  $\text{NaHCO}_3$  (6,7 г; 80,1 ммоль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (188 мг; 0,267 ммоль) в смеси растворителей толуола (80 мл), этанола (50 мл) и воды (10 мл) нагревали при  $108^\circ\text{C}$  в течение 4,5 ч в атмосфере  $\text{N}_2$ . TLC показала завершение реакции. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли воду (20 мл). Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и затем суспендировали в этаноле (100 мл). Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут и фильтровали. Собранное твердое вещество промывали этанолом и сушили в вакууме, получая указанное в заголовке соединение 108-1 в виде белого твердого вещества (10 г; 72%).

Способ В: смесь соединения 107-1 (1,5 г; 3,34 ммоль), соединения R-3-2 (1,6 г; 6,68 ммоль),  $\text{NaHCO}_3$  (0,84 г; 10,0 ммоль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (118 мг; 0,167 ммоль) в смеси растворителей толуола (24 мл), этанола (15 мл) и воды (3 мл) нагревали при  $108^\circ\text{C}$  в атмосфере  $\text{N}_2$  в течение ночи. Реакционную смесь распределяли между дихлорметаном и водой. Органический слой отделяли и промывали раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали в вакууме, получая остаток, который очищали колоночной хроматографией, элюировали смесью гексаны/этилацетат, получая соединение 108-1 в виде белого твердого вещества (1,7 г; 98%).

Т.пл.  $198-202^\circ\text{C}$ . LCMS: 522,30  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.31 (t, J = 7,2 Гц, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.76 (t, J = 4,4 Гц, 4H), 3.93 (t, J = 4,4 Гц, 4H), 3.94 (s, 3H), 4.30 (q, J = 7,2 Гц, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.92 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.47 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 8,8 Гц, 2,0 Гц, 1H), 8.88 (s, 2H), 9.15 (d, J = 2,0 Гц, 1H).

Стадия q(b): метил-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксилат (соединение 108-2)

К смеси соединений 107-2 (20 г; 46,0 ммоль), B-3-1 (9,2 г; 60,2 ммоль; 1,3 экв.) в диоксане (540 мл) при комнатной температуре добавляли твердый  $\text{NaHCO}_3$  (11,6 г; 138,1 ммоль; 3 экв.), после чего добавляли воду (40 мл). Полученную смесь дегазировали путем пропускания  $\text{N}_2$  через поверхность раствора. Затем добавляли хлорид бис(трифенилфосфин)палладия(II) (323 мг; 0,46 ммоль; 0,01 экв.) и полученную смесь нагревали при  $108^\circ\text{C}$  в течение 15 ч. TLC и LCMS показали завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали через целит, пока она оставалась еще горячей (выше  $90^\circ\text{C}$ ), и промывали диоксаном (70 мл). Фильтрат постепенно охлаждали до комнатной температуры, и в течение периода охлаждения

образовывались мелкие белые кристаллы. Суспензию фильтровали и промывали диоксаном (80 мл), получая указанное в заголовке соединение 108-2 в виде белого твердого вещества (18 г; 78%). LCMS (m/z): 508,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.28 (s, 3H), 3.76 (t, J = 4,8 Гц, 4H), 3.82 (s, 3H); 3.92 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.91 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.47 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 8,8 Гц, 2,4 Гц, 1H), 8.88 (s, 2H), 9.15 (d, J = 2,0 Гц, 1H).

Стадия г: N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиридин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид (соединение 1)

#### Приготовление метанольного раствора гидроксиламина

Смесь NH<sub>2</sub>OH.HCl (80 г; 1,12 моль) в MeOH (400 мл) нагревали при 60-65°C в течение 1 ч с образованием прозрачного раствора. Затем его охлаждали в бане с ледяной водой. К холодной смеси по каплям добавляли раствор KOH (96 г; 1,68 моль) в MeOH (240 мл), поддерживая температуру реакционной смеси при 0-10°C. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин и затем фильтровали через воронку при постоянном давлении, заполненную безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (700 г). Фильтрат собирали в условиях ледяной бани и хранили в холодильнике для будущего применения.

#### Получение соединения 1 из соединения 108-1

Соединение 108-1 (10 г; 19 ммоль) суспендировали в указанном выше свежеприготовленном метанольном растворе гидроксиламина (1,79 М; 350 мл). К этой смеси добавляли дихлорметан (100 мл). Реакционную колбу герметично закрывали и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, после чего она превращалась в прозрачный раствор. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 9 ч и фильтровали для удаления любого нерастворенного твердого вещества. Значение pH фильтрата подвели до 6-7 путем добавления уксусной кислоты с образованием твердого осадка. Твердое вещество собирали фильтрованием, и промывали водой и минимальным количеством метанола, сушили в вакууме при 60°C в течение 5 ч, получая соединение 1 в виде белого твердого вещества (9,2 г; 96%). Т.пл. 177-180°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.24 (s, 3H), 3.76 (t, J = 5 Гц, 4H), 3.92 (t, J = 5 Гц, 4H), 3.92 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.90 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.44 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 8,8 Гц, 2,4 Гц, 1H), 8.75 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 9.14 (d, J = 2,0 Гц, 1H), 11.08 (s, 1H).

#### Получение соединения 1 из соединения 108-2

К суспензии соединения 108-2 (31 г; 61,1 ммоль) в дихлорметане (310 мл) при комнатной температуре добавляли указанный выше свежеприготовленный метанольный раствор гидроксиламина (1,79 М; 744 мл). Реакционную колбу герметично закрывали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционная смесь превращалась в прозрачный раствор. Реакционный раствор фильтровали для удаления любого нерастворенного твердого вещества. Затем к фильтрату добавляли воду (310 мл), и во время добавления никакого твердого вещества не образовывалось. Добавляли уксусную кислоту (18,5 мл) для подведения pH до 10,20 (с непрерывным мониторингом на pH-метре) при одновременном перемешивании. В процессе добавления уксусной кислоты не наблюдали никакого изменения внутренней температуры. Полученную реакционную смесь продолжали перемешивать в течение еще 4 ч. Постепенно образовывалось белое твердое вещество. Суспензию фильтровали и промывали минимальным количеством метанола (100 мл × 3). Собранное белое твердое вещество ресуспендировали в метаноле (620 мл) и воде (124 мл) с образованием суспензии. К указанной выше суспензии добавляли дополнительное количество уксусной кислоты (11 г) для подведения pH до 5-6. Наблюдали изменение твердой формы. Суспензию продолжали перемешивать в течение еще 2 ч, фильтровали через фильтровальную бумагу и промывали минимальным количеством метанола (100 мл × 3). Собранное белое твердое вещество сушили в сушильном шкафу (50°C) в течение 12 ч, получая указанное в заголовке соединение 1 в виде белого твердого вещества (23,6 г; 76,0%). Т.пл.: 255-259°C. LCMS (m/z): 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.24 (s, 3H), 3.76 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.92 (t, J = 5,2 Гц, 4H), 3.92 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.91 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 8,4 Гц, 2,4 Гц, 1H), 8.75 (s, 2H), 9.07 (s, 1H), 9.14 (d, J = 2,4 Гц, 1H), 11.14 (s, 1H).

Пример 2. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиридин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид метансульфоната (метансульфонатной соли соединения 1)

Способ А: к смеси соединения 1 (300 мг; 0,59 ммоль) и MeOH/Et<sub>2</sub>O (3/1, 40 мл) добавляли раствор метансульфоновой кислоты (114 мг; 1,18 ммоль) в MeOH (3 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Осадок собирали фильтрованием и промывали Et<sub>2</sub>O, получая соединение 2 в виде белого твердого вещества (260 мг; 73%).

Способ В: к суспензии соединения 1 (1,5 г; 2,95 ммоль) в смеси дихлорметан/MeOH (40 мл/10 мл) добавляли метансульфоновую кислоту (341 мг; 3,55 ммоль) в 2 мл MeOH при комнатной температуре (15°C), получая прозрачный раствор. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционная смесь оставалась прозрачной. К смеси добавляли этилацетат (40 мл) и продолжали перемешивать в течение 3 ч при комнатной температуре. Полученный осадок собирали фильт-

рованием, получая соединение 2 в виде белого твердого вещества (1,45 г; 83%).

Т.пл.: 179-185°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.35 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 3.78 (t, J = 9,6 Гц, 4H), 3.95 (s, 3H), 4.03 (t, J = 9,2 Гц, 4H), 5.24 (s, 2H), 6.99 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.54 (dd, J = 8,8 Гц; 2,4 Гц, 1H), 8.76 (s, 2H), 9.12 (d, J = 2,4 Гц, 1H), 11.11 (br, 1H).

Пример 3. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид натриевой соли (натриевой соли соединения 1)

К суспензии соединения 1 (300 мг; 0,59 ммоль) в метаноле (30 мл) при 0°C медленно добавляли трет-BuONa (85 мг; 0,88 ммоль). Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивать в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали, остаток растирали и промывали этанолом, затем фильтровали, получая соединение 3 в виде белого твердого вещества (230 мг; 73%). Т.пл.: 178-183°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.17 (s, 3H), 3.75 (s, 4H), 3.92 (s, 7H), 5.16 (s, 2H), 6.90 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 7.42 (s, 1H), 8.57 (d, J = 8,0 Гц, 1H), 8.65 (s, 2H), 9.14 (s, 1H).

Пример 4. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид калиевой соли (калиевой соли соединения 1)

К смеси соединения 1 (400 мг; 0,78 ммоль) в метаноле (50 мл) добавляли трет-BuOK (132 мг; 1,17 ммоль) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и продолжали перемешивать при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Нерастворенное твердое вещество удаляли фильтрованием и фильтрат охлаждали до -20°C. К фильтрату добавляли Et<sub>2</sub>O (100 мл). Полученную смесь перемешивали при -20°C течение 1 ч. Добавляли гексаны (70 мл) и смесь продолжали перемешивать при -20°C течение 2 ч. Твердое вещество собирали фильтрованием и сушили в вакууме, получая соединение 4 в виде белого твердого вещества (150 мг; 35%). Т.пл.: 174-179°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.16 (s, 3H), 3.74-3.76 (m, 4H), 3.90-3.93 (m, 7H), 5.15 (s, 2H), 6.90 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 7.43 (s, 1H), 8.39 (br, 1H), 8.58 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 8.62 (s, 2H), 9.15 (s, 1H).

Пример 5. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид в виде холиновой соли (холиновая соль соединения 1)

К раствору соединения 1 (200 мг; 0,39 ммоль) в смеси DCM (дихлорметан)/MeOH (60 мл/12 мл) добавляли гидроксид холина (106 мг; 0,39 ммоль; 45%-ный раствор в MeOH). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и затем концентрировали, удаляя примерно 30 мл растворителя. Добавляли этилацетат (60 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После выпадения небольшого количества осадка смесь концентрировали, удаляя примерно 40 мл растворителя, и добавляли дополнительное количество этилацетата (60 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и фильтровали, получая соединение 5 в виде белого твердого вещества (180 мг; 76%). Т.пл.: 181-185°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.11 (s, 9H), 3.17 (s, 3H), 3.40 (t, J = 4,8 Гц, 2H), 3.75 (t, J = 4,8 Гц, 4H), 3.84 (br, 2H), 3.90-3.93 (m, 7H), 5.15 (s, 2H), 6.89 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 7.41 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 8,8 Гц; 2,4 Гц, 1H), 8.64 (s, 2H), 9.14 (d, J = 2,0 Гц, 1H).

Пример 6. Получение N-гидрокси-2-(((2-(6-метоксипиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид сульфата (сульфатной соли соединения 1)

К суспензии соединения 1 (200 мг; 0,39 ммоль) в смеси DCM/MeOH (30 мл/7,5 мл) добавляли серную кислоту (77 мг; 0,79 ммоль; в 1 мл MeOH), получая прозрачный раствор. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Происходило выпадение осадка, и после этого добавляли трет-бутил-метиловый эфир (60 мл). Полученную смесь продолжали перемешивать в течение 1 ч при комнатной температуре. Твердое вещество собирали фильтрованием, получая соединение 6 в виде белого твердого вещества (180 мг; 76%). Т.пл.: 243-246°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.26 (s, 3H), 3.78 (t, J = 4,8 Гц, 4H), 3.96 (s, 3H), 4.03 (t, J = 4,4 Гц, 4H), 5.24 (s, 3H), 6.98 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.54 (dd, J = 8,8 Гц; 2,4 Гц, 1H), 8.76 (s, 2H), 9.12 (d, J = 2,0 Гц, 1H), 11.06 (br, 1H).

Пример 7. N-гидрокси-2-(метил((2-(6-(метиламино)пиримидин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)амино)пиримидин-5-карбоксамид (соединение 2)

Стадия 7a: (2-хлор-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидин-6-илметил)метиламин (соединение 0503)

К раствору соединения 0112 (20,0 г; 70,4 ммоль) в метаноле (125 мл) добавляли раствор метиламина в метаноле (27%-ный (об./об.); 75 мл; 563,2 ммоль) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме, получая неочищенный твердый продукт, который растворяли в метаноле (550 мл) и THF (220 мл) в атмосфере азота. Порциями

добавляли боргидрид натрия (8 г; 211,2 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь упаривали в вакууме и добавляли воду (300 мл). Водную смесь экстрагировали метиленхлоридом, объединенные экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали. Остаток растворяли в 6 М растворе  $\text{HCl}$  (230 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Водный раствор несколько раз промывали метиленхлоридом и значение pH подводили до 9-10, используя  $\text{NaOH}$  (4 н. раствор). Выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрованием и сушили (60°C, 6 ч), получая светло-желтое твердое вещество (18 г; 85%).

LCMS: 299  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.32 (s, 3H), 3.74 (t,  $J = 5,2$  Гц, 4H), 3.88 (t,  $J = 5,2$  Гц, 4H), 3.96 (s, 2H), 7.24 (s, 1H).

Стадия 7b: 2-[(2-хлор-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидин-6-илметил)метиламино]пиримидин-5-карбоновой кислоты этиловый эфир (соединение 0504)

Смесь соединения 0503 (10 г; 33,6 ммоль),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400 мл) и 0305 (6,8 г; 36,4 ммоль) перемешивали при комнатной температуре. Затем добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA) (220 мл; 1,26 моль), раствор перемешивали в течение ночи и упаривали. После добавления метиленхлорида (300 мл) органическую фазу промывали водой, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в вакууме, получая остаток. К остатку добавляли этилацетат и смесь перемешивали в бане с ледяной водой в течение 50 мин. Указанный в заголовке продукт 0504 собирали в виде белого твердого вещества (10,6 г; 70%). LCMS: 449  $[\text{M}+1]^+$ ;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.30 (t,  $J = 7,2$  Гц, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.71 (t,  $J = 5,2$  Гц, 4H), 3.83 (t,  $J = 4,8$  Гц, 4H), 4.29 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 8.87 (s, 2H).

Стадия 7c: этил-2-(метил((2-(6-(метиламино)пиридин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метиламино)пиримидин-5-карбоксилат (соединение 0603-111)

Смесь N-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридин-2-амин (0602-227) (351 мг; 1,5 ммоль), соединения 0504 (314 мг, 0,7 ммоль),  $\text{NaHCO}_3$  (176 мг; 2,1 ммоль) и дихлорида бис(трифенилфосфин)палладия ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ; 24,6 мг; 0,035 ммоль) растворяли в смеси толуол/ $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2,5 мл/1,6 мл/0,7 мл). Затем реакционную смесь перемешивали при 120°C в микроволновом реакторе в течение 2 ч. К этой смеси добавляли воду (8 мл) и экстрагировали этилацетатом (15 мл  $\times$  3). Органический слой сушили, концентрировали, очищали колоночной хроматографией (метанол в дихлорметане, 5%-ный (об./об.)), получая указанное в заголовке соединение 0603-111 (150 мг; 41%) в виде белого твердого вещества. LCMS: 521  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.28 (t,  $J = 7,2$  Гц, 3H), 2.81 (d,  $J = 4,4$  Гц, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.73 (d,  $J = 4,4$  Гц, 4H), 3.86 (d,  $J = 4,4$  Гц, 4H), 4.27 (q,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 5.20 (s, 2H), 6.48 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 6.91 (d,  $J = 4,4$  Гц, 1H), 7.39 (s, 1H), 8.25 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 8.86 (s, 2H), 8.90 (s, 1H).

Стадия 7d: N-гидрокси-2-(метил((2-(6-(метиламино)пиридин-3-ил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метиламино)пиримидин-5-карбоксамид (соединение 2)

Соединение 2 получали в виде коричневого твердого вещества (21 мг; 14%) из соединения 0603-236 (150 мг; 0,29 ммоль) и свежеприготовленного метанольного раствора гидроксилана (6 мл), используя методику, аналогичную описанной в примере 1: т.пл. 193-195°C. LCMS: 508  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.83 (d,  $J = 4,8$  Гц, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.74 (m, 4H), 3.89 (m, 4H), 5.20 (s, 2H), 6.50 (d,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 6.92 (d,  $J = 5,2$  Гц, 1H), 7.39 (s, 1H), 8.27 (dd,  $J = 8,8$  Гц; 2,0 Гц, 1H), 8.75 (s, 2H), 9.01 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 9.07 (br, 1H).

Пример 8. 2-(((2-(4-Аминофенил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метиламино)-N-гидрокси)пиримидин-5-карбоксамид (соединение 3)

Стадия 8a: N-(4-бромфенил)ацетамид (соединение 0601-150)

К раствору 4-броманилина (6,3 г; 63,7 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) добавляли ацетилхлорид (3,75 г; 47,7 ммоль) и триэтиламин (TEA; 7,4 г; 73,4 ммоль) при 0°C, перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь промывали водой, рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение 0601-150 (3,6 г; 46%) в виде коричневого твердого вещества. LCMS: 214  $[\text{M}+1]^+$ ;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.05 (s, 3H), 7.46 (d,  $J = 8,8$  Гц, 2H), 7.57 (d,  $J = 8,8$  Гц, 2H), 10.12 (s, 1H).

Стадия 8b: N-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)ацетамид (соединение 0602-150)

Указанное в заголовке соединение 0602-150 получали (2,3 г; 94%) в виде белого твердого вещества из соединения 0601-150 (2,0 г; 9,3 ммоль), бис(пинаколато)дибора (4,4 г; 17,5 ммоль), ацетата калия (3,5 г; 14 ммоль) и  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})_2$  (76 мг; 0,088 ммоль), используя методику, аналогичную описанной для соединения 0602-107 (пример 34). LCMS: 262  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  1.27 (d,  $J = 6,8$  Гц, 12H), 2.04 (s, 3H), 7.58 (s, 4H), 10.03 (s, 1H).

Стадия 8c: этил-2-(((2-(4-аминофенил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метиламино)пиримидин-5-карбоксилат (соединение 0603-150)

Смесь соединения 0504-54 (210 мг; 0,46 ммоль), соединения 0602-150 (159 мг; 0,60 ммоль), гидро-

карбоната натрия (118 мг; 1,4 ммоль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (17 мг; 0,02 ммоль) в толуоле (4 мл), этаноле (2 мл) и воде (1 мл) промывали сильной струей азота и нагревали в условиях облучения микроволнами при 120°C в течение 2 ч. Реакционную смесь распределяли между этилацетатом и водой, органический слой промывали рассолом, сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток промывали дихлорметаном, получая этил-2-(((2-(4-ацетамидофенил)-4-морфолинотиено-[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)пиримидин-5-карбоксилат (136 мг; 53%) в виде белого твердого вещества. LCMS: 548 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.29 (t, J = 7,2 Гц, 3H), 2.06 (s, 6H), 3.26 (s, 3H), 3.75 (m, 4H), 3.91 (m, 4H), 4.28 (q, J = 7,2 Гц, 2H), 5.22 (s, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.67 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 8.31 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 8.87 (s, 1H), 10.10 (s, 1H).

К раствору вышеуказанного этилового эфира (280 мг; 0,51 ммоль) в THF (10 мл) добавляли водный раствор HCl (6 M, 15 мл) при 40°C, перемешивали в течение 2 ч, реакционную смесь нейтрализовали, используя NaHCO<sub>3</sub>, и экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, органический слой промывали водой, рассолом, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали, очищали колоночной хроматографией (метанол в дихлорметане, 2%-ный (об./об.)), получая указанное в заголовке соединение 0603-150 (180 мг; 48%) в виде белого твердого вещества. LCMS: 506 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.29 (t, J = 7,6 Гц, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.73 (m, 4H), 3.86 (m, 4H), 4.27 (q, J = 6,8 Гц, 2H), 5.20 (s, 2H), 6.59 (d, J = 8,8 Гц, 2H), 7.36 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8,0 Гц, 2H), 8.86 (s, 1H).

Стадия 8d: 2-(((2-(4-аминофенил)-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)(метил)амино)-N-гидроксипиримидин-5-карбоксамид (соединение 3)

Получали соединение 3 (43 мг; 26%) в виде желтого твердого вещества из соединения 0603-150 (170 мг; 0,3 ммоль) и свежеприготовленного метанольного раствора гидроксилamina (4 мл), используя методику, аналогичную таковой, описанной в примере 1. Т.пл. 183-186°C. LCMS: 493 [M+1]<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.22 (s, 3H), 3.74 (m, 4H), 3.87 (m, 4H), 4.27 (q, J = 6,8 Гц, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 6.59 (d, J = 8,8 Гц, 2H), 7.36 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8,0 Гц, 2H), 8.86 (s, 2H).

Пример 9. Анализ активности P13-киназы

Для определения способности соединения 1 ингибировать различные изоформы и мутантные формы P13K использовали следующие анализы.

#### P13Kα

Активность P13Kα измеряли с использованием люминесцентного анализа киназ ADP-Glo. P13Kα, комплекс рекомбинантной полноразмерной субъединицы p110α человека, меченной по N-концу глутатион-S-трансферазой (GST), и немеченной рекомбинантной полноразмерной субъединицы p85α человека, совместно экспрессировали в инфицированных бакуловирусом клетках Sf9 с применением бакуловирусной экспрессионной системы (№ доступа в GenBank для p110α, U79143; для p85α, XM\_043865). Белки очищали аффинной хроматографией за одну стадию с использованием глутатион-агарозы. Проводили конкурентный анализ, измеряя количество аденозиндифосфата (АДФ), образовавшегося из аденозинтрифосфата (АТФ) в присутствии очищенной рекомбинантной P13Kα (p110α/p85α) и фосфатидилинозитбифосфата (PIP2). P13Kα инкубировали с 20 мкМ субстратом PIP2 в реакционном буфере (50 мМ HEPES (2-гидроксиэтил-пиперазин-2-этансульфоновая кислота), pH 7,4; 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мкМ ортованадат Na, 1 мМ дитиотреит (DTT), 10 мкМ сверхчистый АТФ и 0,5% DMSO) в течение 30 мин при 30°C. Затем измеряли АДФ, образовавшийся в данной реакции, применяя анализ ADP-Glo. Это анализ проводили в две стадии; сначала добавляли равный объем реагента ADP-GLO™ (Promega) для остановки киназной реакции и израсходования оставшегося АТФ. На второй стадии добавляли реагент для детекции киназы, который одновременно способствует превращению АДФ в АТФ. Вновь синтезированный АТФ измеряли, используя сопряженную люциферин/люциферазную реакцию. Значение IC<sub>50</sub> (концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование), определенное для соединения 1 в этом анализе, составляло меньше 100 нМ.

Кроме того, определяли способность соединения 1 ингибировать мутантные формы P13Kα с мутациями H1047R и E545K, используя общую методику, описанную выше. Значение IC<sub>50</sub>, определенное для обеих мутантных форм, составляло меньше 100 нМ.

#### P13Kβ

Активность P13Kβ измеряли с использованием анализа резонансного переноса энергии флуоресценции с разрешением по времени (TR-FRET), применяя технологию гомогенной флуоресценции с разрешением по времени (HTRF). P13Kβ, комплекс рекомбинантной полноразмерной субъединицы p110β человека, меченной по N-концу гистидиновой меткой, и немеченной рекомбинантной полноразмерной субъединицы p85α человека, совместно экспрессировали в инфицированных бакуловирусом клетках Sf21 с применением бакуловирусной экспрессионной системы (№ доступа в GenBank для p110β, NM\_006219; для p85α, XM\_043865). Белки очищают аффинной хроматографией за одну стадию с использованием глутатион-агарозы. Проводили конкурентный анализ, измеряя количество фосфатидилинозит-трифосфата (PIP3), образовавшегося из PIP2 в присутствии очищенной рекомбинантной P13K-бета

(p110 $\beta$ /p85 $\alpha$ ). PI3K $\beta$  инкубировали с 10 мкМ субстратом PIP2 в реакционном буфере (20 мМ HEPES, pH 7,5; 10 мМ NaCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT, 10 мкМ АТФ и 1% DMSO) в течение 30 мин при 30°C. Затем продукт реакции смешивали с PIP3-детектирующим белком, а именно меченным европием антителом, биотин-меченным зондом для PIP3 и аллофиикоцианин-меченным стрептавидином. Образуется комплекс сенсоров, генерирующий стабильный сигнал TR-FRET в реакционной смеси. Интенсивность этого сигнала уменьшается по мере того, как связывание биотин-меченного зонда с детектором PIP3 заменяется на образование PIP3 под действием ферментативной активности, и в смеси возрастает количество несвязанного биотин-меченного зонда для PIP3. Сигнал TR-FRET определяли, используя микропланшетный ридер с вычитанием фона.

Значение IC<sub>50</sub>, определенное для соединения 1 в этом анализе, составляло от 100 до 1000 нМ.

#### PI3K $\delta$

Активность PI3K $\delta$  измеряли с использованием анализа поляризации флуоресценции. PI3K $\delta$ , комплекс рекомбинантной полноразмерной субъединицы p110 $\delta$  человека, меченной по N-концу гистидиновой меткой, и немеченной рекомбинантной полноразмерной субъединицы p85 $\alpha$  человека, совместно экспрессировали в инфицированных бакуловирусом клетках Sf9 с применением бакуловирусной экспрессионной системы (№ доступа в GenBank для p110 $\delta$ , NM\_005026). Белки очищают аффинной хроматографией за одну стадию с использованием глутатион-агарозы. Проводили конкурентный анализ, измеряя количество PIP3, образовавшегося из PIP2 в присутствии очищенной рекомбинантной PI3K $\delta$  (p110 $\delta$ /p85 $\alpha$ ). PI3K $\delta$  инкубировали с 10 мкМ субстратом PIP2 в реакционном буфере (20 мМ HEPES (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT, 10 мкМ АТФ и 1% DMSO) в течение 1 ч при 30°C. Затем продукт реакции смешивали с PIP3-детектирующим белком и флуоресцентным зондом для PIP3. Значения поляризации (в mP) уменьшаются по мере того, как связывание флуоресцентного зонда с детектором PIP3 заменяется на образование PIP3 под действием ферментативной активности, и в смеси возрастает количество несвязанного флуоресцентного зонда. Значения степени поляризации (в mP) определяли, используя микропланшетный ридер с вычитанием фона.

Значение IC<sub>50</sub>, определенное для соединения 1 в этом анализе, составляло меньше 100 нМ.

#### PI3K $\gamma$

Активность PI3K $\gamma$  измеряли с использованием анализа резонансного переноса энергии флуоресценции с разрешением по времени (TR-FRET), применяя технологию гомогенной флуоресценции с разрешением по времени (HTRF). Меченную по N-концу гистидиновой меткой PI3K $\gamma$  человека экспрессировали в инфицированных бакуловирусом клетках Sf9 с применением бакуловирусной экспрессионной системы (номер доступа в GenBank AF327656). Белки очищают аффинной хроматографией за одну стадию с использованием глутатион-агарозы. Проводили конкурентный анализ, измеряя количество PIP3, образовавшегося из PIP2 в присутствии очищенной рекомбинантной PI3K $\gamma$  (p120 $\gamma$ ). PI3K $\gamma$  (2 нМ) инкубировали с 10 мкМ PIP2 субстратом в реакционном буфере (20 мМ HEPES, pH 7,5; 10 мМ NaCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT, 10 мкМ АТФ и 1% DMSO) в течение 30 мин при 30°C. Затем продукт реакции смешивали с PIP3-детектирующим белком, а именно меченным европием антителом, биотин-меченным зондом для PIP3 и аллофиикоцианин-меченным стрептавидином. Образуется комплекс сенсоров, генерирующий стабильный сигнал TR-FRET в реакционной смеси. Интенсивность этого сигнала уменьшается по мере того, как связывание биотин-меченного зонда с детектором PIP3 заменяется на образование PIP3 под действием ферментативной активности, и в смеси возрастает количество несвязанного биотин-меченного зонда для PIP3. Сигнал TR-FRET определяли, используя микропланшетный ридер с вычитанием фона.

Значение IC<sub>50</sub>, определенное для соединения 1 в этом анализе, составляло от 100 до 1000 нМ.

#### Пример 10. Анализ активности HDAC

Ингибирование активности HDAC оценивали, используя систему Biomol Color de Lys (AK-500, Biomol, Plymouth Meeting, PA). Кратко, экстракты ядер клеток HeLa использовали в качестве источника HDAC. Готовили серийные разведения тестируемых соединений в диметилсульфоксиде (DMSO) для получения разных концентраций и добавляли к экстрактам ядер клеток HeLa в присутствии искусственного субстрата для колориметрической детекции. В качестве конечных условий анализа использовали 50 мМ трис/Cl, pH 8,0; 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Реакции проводили при комнатной температуре (25°C) в течение 1 ч, после чего добавляли проявляющее вещество для прекращения реакции.

Относительную ферментативную активность измеряли в микропланшетном ридере WALLAC Victor II 1420 в виде интенсивности флуоресценции (возбуждение: 350-380 нм; излучение: 440-460 нм). Данные анализировали, используя программное обеспечение GraphPad Prism (версию 4.0a) с аппроксимацией сигмоидальной кривой зависимости ответа от дозы для расчета IC<sub>50</sub>. Значение IC<sub>50</sub>, определенное для соединения 1 в этом анализе, составляло меньше 100 нМ.

Также определяли активности соединения 1 в отношении изоформ HDAC. Анализы специфичности в отношении HDAC проводили в BPS Bioscience (San Diego, CA), следуя применяемой в этой организации стандартной рабочей методике. Кратко, очищенные ферменты, меченные метками flag (в случае HDAC-1 человека), NCOR2 (корепрессор ядерных рецепторов 2) (в случае HDAC-3 человека), GST (в случае HDAC-4, -6, -7, -10 и -11 человека) или His (в случае HDAC-2, -5, -8 и -9 человека), экспрессиро-

вали в клетках насекомых линии Sf9 и очищали перед применением. В качестве субстрата для HDAC-1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 и 11 использовали субстрат для HDAC 3, разработанный в BPS Bioscience. В случае других ферментов HDAC использовали субстрат для HDAC класса 2a. Все ферментативные реакции проводили в двух повторах при 37°C в течение 30 минут за исключением анализа фермента HDAC-11, который проводили при комнатной температуре в течение 3 часов.

В представленной ниже таблице приведены результаты для каждой из HDAC 1-11, при этом значения IC50 показаны следующим образом: I больше 1000 нМ; 100 нМ меньше II меньше 1000 нМ; 10 нМ меньше III меньше 100 нМ; IV меньше 10 нМ.

HDAC	1	2	3	8	4	5	6	7	9	10	11
IC50	IV	IV	IV	II	II	II	111	II	II	IV	IV

Пример 11. Исследование соединения 1 и антитела к PD-1 в мышечной модели ксенотрансплантата клеток карциномы толстой кишки мышей CTW26.WT

Животные: самки мышей Balb/c, возраст 8 недель, получавшие корм с высоким содержанием жиров.

#### Соединения

Соединение 1: вводимое перорально (по.) в дозе 50 мг/кг по схеме: через 5 суток после приема следуют 2 суток отдыха (5+2-).

Изотипический контроль: очищенный 1gG2a LEAFTM, полученный от BioLegend™, San Diego, CA; вводимый внутривенно (в.в.) в дозе 100 мкг/мышь, 2 раза в неделю (2x/нед).

Антитело к PD-1: антитело крысы к мышечному CD279 (PD-1) LEAFTM, клон 29F.1A12, полученное от BioLegend™, San Diego, CA; вводимое в.в. в дозе 100 мкг/мышь, 2x/нед.

#### Введение клеток

CT26.WT-клетки собирали из колб и один раз промывали в среде 1640 от Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI), не содержащей никаких добавок. Готовили растворы в конечных концентрациях, используя питательную среду без добавок (RPMI-1640), и хранили на льду до введения мышам. На 7-е сутки или 8-е сутки, как только опухоли пальпировались, мышам распределяли по группам и рандомизировали согласно массе тела. Лечение начинали с использованием антитела, и незамедлительно вводили соединение 1.

#### Распределение по группам

Группа	Кол-во	Подробное описание введения
1	8	Разбавитель (разбавитель для соединения 1 - 30%-ный CAPTISOL™)
2	8	Соединение 1, 50 мг/кг (5+2-)
3	8	Отрицательный изотипический контроль, 100 мкг/мышь (один раз в сутки (1x/сут), 2x в неделю)
4	8	Антитело к PD-1 (1A12) 100 мкг/мышь (1x/сут, 2x в неделю)
5	8	Соединение 1, 50 мг/кг (5+2-) Отрицательный изотипический контроль, 100 мкг/мышь (1x/сут, 2x в неделю)
6	8	Соединение 1, 50 мг/кг (5+2-) Антитело к PD-1 (1A12) 100 мкг/мышь (1x/сут, 2x в неделю)

#### План исследования

Мониторинг животных проводили до начала введения доз, а затем измерения выполняли два раза в неделю в ходе введения до тех пор, пока объем опухоли не достигал заявленного в протоколе предела или пока изъязвление не становилось слишком серьезным. В конце исследования собирали опухолевую ткань и кровь/плазму.

#### Результаты

Результаты этого исследования представлены в приведенной ниже таблице и на фиг. 1. В группах 1-3 было по 7 мышей, которые подлежали оценке. В группах 4-6 оценке подлежали все 8 мышей. В случае применения только соединения 1 в дозе 50 мг/кг было продемонстрировано очень незначительное ингибирование опухолевого роста. В случае применения антитела к PD-1 было показано более сильное ингибирование опухолевого роста, но все еще ниже 50%. Однако, в случае применения комбинации соединения 1 и антитела к PD-1 было показано почти полное ингибирование опухолевого роста.

Лекарственное средство	Дозировка	TGI (ингибирование роста опухоли), %* (15-е сутки)	p-значение* (t-критерий Стьюдента)	Кол-во мышей (15-е сутки)
Разбавитель (для соед. 1)	-	на (данные не приведены)	на	7/8
Изотипическое контрольное mAb (моноклональное антитело)	100 мкг	на	на	7/8
Соед. 1	50 мг/кг	3	ns (незначимое)	7/8
Соед. 1 + изотипическое контрольное mAb	50 мг/кг + 100 мкг	16	ns	8/8
mAb к PD-1	100 мкг	44	меньше 0,05	8/8
Соед. 1 + mAb к PD-1	50 мг/кг + 100 мкг	97	меньше 0,0001	8/8
		* Относительно группы, получавшей разбавитель (для соед. 1)		

Пример 12. Исследование соединения 1 и антитела к PD-1 в мышинной модели ксенотрансплантата A20

Животные: самки мышей Balb/c, возраст 4-5 недель, получавшие регулярное кормление.

#### Соединения

Соединение 1: вводимое п.о. в дозе 50 мг/кг или 100 мг/кг по схеме: через 5 суток приема следуют 2 суток отдыха (5 прием/2 отдых).

Изотипический контроль: очищенный igG2a крысы LEAF™, полученный от BioLegend™, San Diego, CA; вводимый в.б. в дозе 100 мкг/мышь, 2х/нед, 3 недели.

Антитело к PD-1: антитело крысы к мышинному CD279 (PD-1) LEAF™, клон 29F.1A12, полученное от BioLegend™, San Diego, CA; вводимое в дозе 100 мкг/мышь, 2х/нед, 3 недели.

Разбавитель: разбавитель для соединения 1 - 30%-ный Captisol™; вводимый по схеме 5 прием/2 отдых, п.о., 3 недели.

#### Введение клеток

Сингенные клетки A20 собирали из колб и один раз промывали в среде RPMI 1640, не содержащей никаких добавок. Готовили растворы в конечных концентрациях, используя питательную среду без добавок (RPMI-1640), и хранили на льду до введения мышам. Животным имплантировали  $2 \times 10^5$  клеток в правый бок. Введение начинали, когда размер опухолей превышал 100 мм<sup>3</sup> (примерно на 13-е сутки), и введение продолжали в течение 21 суток или до тех пор, пока опухоли не достигали предельного размера 2000 мм<sup>3</sup>.

#### Распределение по группам

Группа	Кол-во	Подробное описание введения
1	8	Разбавитель Изотипический контроль
2	8	Антитело к PD-1
3	8	Соединение 1, 100 мг/кг
4	8	Соединение 1, 100 мг/кг Антитело к PD-1

#### План исследования

Введение доз животным начинали примерно на 13-е сутки, когда опухоли полностью пальпируются, и их можно измерить. Введение доз продолжали до тех пор, пока в опухолях не начинается изъязвление, требующее умерщвления. Опухоли отбирали до достижения обширного некроза с целью проведения иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) и проточного анализа.

#### Результаты

Результаты этого исследования представлены в приведенной ниже таблице и на фиг. 2. В случаях применения и одного только соединения 1 в дозе 100 мг/кг, и одного только антитела к PD-1 наблюдали значительное ингибирование опухолевого роста. В случае применения комбинации соединения 1 и антитела к PD-1 наблюдали более сильное ингибирование опухолевого роста, чем в случае любого агента по

отдельности.

Лекарственное средство	Дозировка	TGI, %* (13-е сутки)	p-значение* (t-критерий Стьюдента)	Кол-во мышей (13-е сутки)
Разбавитель (для соед. 1) + изотипический контроль	-	na	na	8/8
mAb к PD-1	100 мкг	49	ns	8/8
Соед. 1	100 мг/кг	60	< 0,05	8/8
Соед. 1 + mAb к PD-1	100 мг/кг + 100 мкг	75	< 0,005	8/8
		* Относительно группы, получавшей разбавитель (для соед. 1) + изотипический контроль		

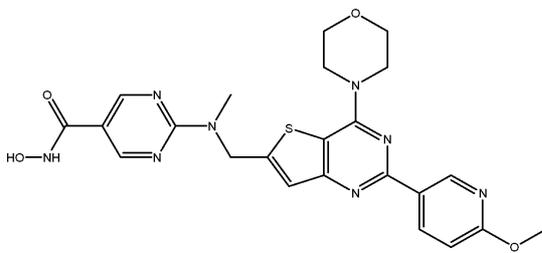
Упомянутая в данном описании патентная и научная литература составляет основу знаний, имеющихся в распоряжении у специалистов в данной области техники. Все патенты Соединенных Штатов Америки и опубликованные или неопубликованные заявки на патент Соединенных Штатов Америки, процитированные в данном описании, включены посредством ссылки. Все опубликованные зарубежные патенты и патентные заявки, процитированные в данном описании, тем самым включены посредством ссылки. Все другие опубликованные ссылки, документы, монографии и научная литература, процитированные в данном описании, тем самым включены посредством ссылки.

Несмотря на то, что данное изобретение конкретно продемонстрировано и описано с упоминанием его предпочтительных воплощений, специалистам в данной области техники будет понятно, что в него могут быть внесены, без отклонения от объема данного изобретения, различные изменения по форме и в деталях, охваченные прилагаемой формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения карциномы толстой кишки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение данному субъекту:

(a) соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли и

(b) ингибитора передачи сигнала, опосредуемой белком 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), при этом соединение или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в количествах, которые в комбинации оказываются терапевтически эффективными

2. Способ по п.1, где ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой ингибитор одного или более чем одного из PD-1, PD-L1 и PD-L2.

3. Способ по п.2, где ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала ингибирует PD-1 или PD-L1.

4. Способ по п.2, где ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой пембролизумаб, ниволумаб, ателолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или пидилизумаб.

5. Способ по п.4, где ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

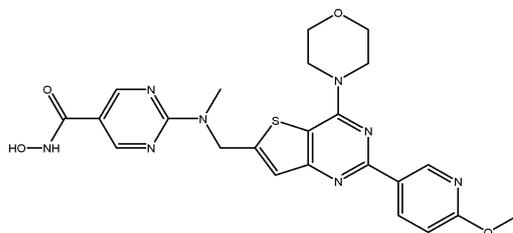
6. Способ по любому из пп.1-5, где:

(a) соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту одновременно в виде отдельных композиций или

(b) соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят субъекту последовательно в виде отдельных композиций.

7. Способ по любому из пп.1-5, где соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала вводят в единой композиции.

8. Фармацевтическая композиция для лечения карциномы толстой кишки содержащая:  
(а) соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,  
(b) ингибитор PD-1-опосредуемой передачи сигнала и  
(с) фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

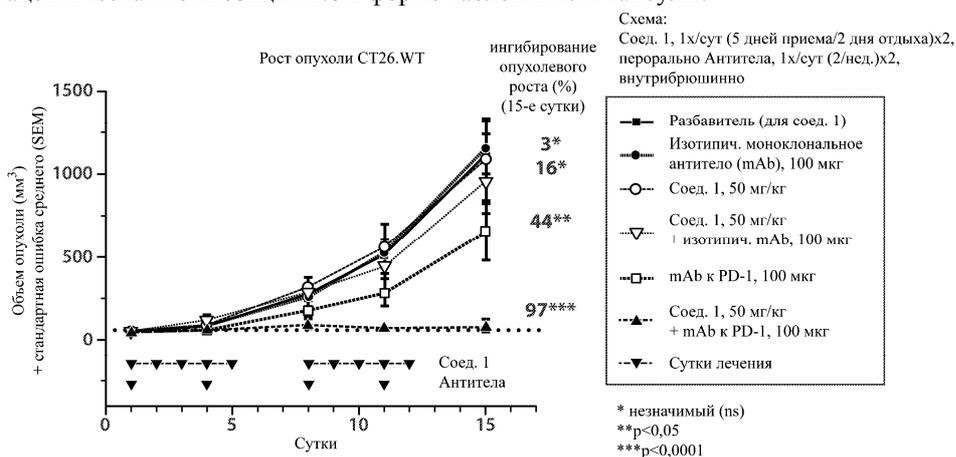
9. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой ингибитор передачи сигнала PD-1 представляет собой ингибитор одного или нескольких из PD-1, PD-L1 и PD-L2.

10. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой ингибитор передачи сигнала PD-1 ингибирует PD-1 или PD-L1.

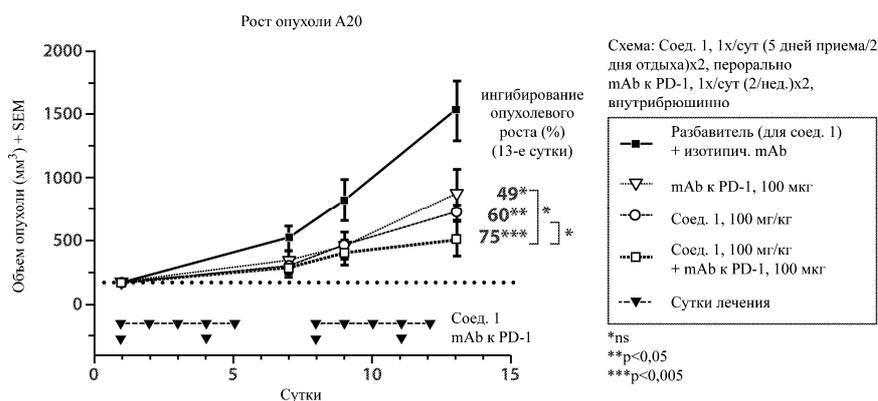
11. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой ингибитор передачи сигнала PD-1 представляет собой пембролизумаб, ниволумаб, ателолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или пидилизумаб.

12. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой ингибитор передачи сигнала PD-1 представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.

13. Фармацевтическая композиция п.8 в форме таблетки или капсулы.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2