

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291964** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.06.08

(51) Int. Cl. *C07D 403/04* (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.22

(54) **ЗАМЕЩЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ХИНАЗОЛИНИЛА, ПРИМЕНИМЫЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК**

(31) 201911053553

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.23

**Велапартхи Апендер, Олсон Ричард Е.
(US), Варриер Джайякумар Санкара,
Рахаман Хасибур (IN)**

(33) IN

(86) PCT/US2020/066508

(87) WO 2021/133751 2021.07.01

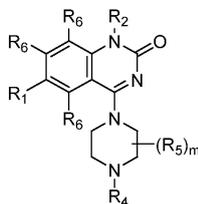
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(57) Раскрыты соединения формулы (I)



или их соли, где R₁, R₂, R₄, R₅, R₆ и m определены в настоящем документе. Также раскрыты способы применения таких соединений для ингибирования активности одной или обеих из диацилглицеролкиназы альфа (DGK α) и диацилглицеролкиназы дзета (DGK ζ), а также фармацевтические композиции, содержащие такие соединения. Эти соединения полезны при лечении вирусных инфекций и пролиферативных нарушений, таких как рак.

A1

202291964

202291964

A1

ЗАМЕЩЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ХИНАЗОЛИНИЛА, ПРИМЕНИМЫЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с индийской предварительной заявкой 201911053553, поданной 3 декабря 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящий документе посредством ссылки.

Описание изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к замещенным соединениям хиназолинила, которые активируют Т-клетки, способствуют пролиферации Т-клеток и/или проявляют противоопухолевую активность. В настоящем документе представлены замещенные соединения хиназолинила, композиции, содержащие такие соединения, и способы их применения. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно соединение в соответствии с изобретением, которые можно применять для лечения пролиферативных нарушений, таких как рак и вирусные инфекции.

Предпосылки создания изобретения

Рак человека характеризуется многочисленными генетическими и эпигенетическими изменениями, вызывающими образование неоантигенов, потенциально распознаваемых иммунной системой (Sjoblom et al. (2006) *Science* 314:268-74). Адаптивная иммунная система, состоящая из Т- и В-лимфоцитов, обладает мощным противораковым потенциалом с широкой способностью и исключительной специфичностью реагировать на различные опухолевые антигены. Кроме того, иммунная система демонстрирует значительную пластичность и компонент памяти. Успешное использование всех этих свойств адаптивной иммунной системы сделало бы иммунотерапию уникальной среди всех методов лечения рака. Однако, хотя эндогенный иммунный ответ на рак наблюдался в доклинических моделях и у пациентов, этот ответ является неэффективным, и верифицированные злокачественные опухоли рассматривались как «самостоятельные» и допускались иммунной системой. Способствуя этому состоянию толерантности, опухоли могут использовать несколько различных механизмов для активного подрыва противоопухолевого иммунитета. Эти механизмы включают дисфункциональную передачу сигналов Т-клетками (Mizoguchi

et al., (1992) *Science* 258:1795-98), подавляющие регуляторные клетки (Facciabene et al., (2012) *Cancer Res.* 72:2162-71), и кооптацию эндогенных «иммунных контрольных точек», которые служат для понижающего модулирования интенсивности адаптивных иммунных ответов и защиты нормальных тканей от сопутствующего повреждения опухолями, чтобы избежать уничтожения иммунной системой (Topalian et al., (2012) *Curr. Opin. Immunol.* 24:1-6; Mellman et al. (2011) *Nature* 480:480-489).

Диацилглицеролкиназы (DGK) представляют собой липидкиназы, которые опосредуют превращение диацилглицерина в фосфатидную кислоту, тем самым прекращая функции Т-клеток, распространяющиеся через сигнальный путь TCR. Таким образом, DGK служат в качестве внутриклеточных контрольных точек, и ожидается, что ингибирование DGK усилит Т-клеточные сигнальные пути и активацию Т-клеток. Подтверждающие данные включают мышинные модели с нокаутом DGK α или DGK ζ , которые демонстрируют гиперчувствительный фенотип Т-клеток и улучшенную противоопухолевую иммунную активность (Riese M.J. et al., *Journal of Biological Chemistry*, (2011) 7: 5254-5265; Zha Y et al., *Nature Immunology*, (2006) 12:1343; Olenchok B.A. et al., (2006) 11:1174-81). Кроме того, наблюдалось, что инфильтрирующие опухоль лимфоциты, выделенные у пациентов с почечно-клеточной карциномой человека, сверхэкспрессируют DGK α , что приводит к ингибированию функции Т-клеток (Prinz, P.U. et al., *J Immunology* (2012) 12:5990-6000). Таким образом, DGK α и DGK ζ рассматриваются в качестве мишеней для иммунотерапии рака (Riese M.J. et al., *Front Cell Dev Biol.* (2016) 4: 108; Chen, S.S. et al., *Front Cell Dev Biol.* (2016) 4: 130; Avila-Flores, A. et al., *Immunology and Cell Biology* (2017) 95: 549-563; Noessner, E., *Front Cell Dev Biol.* (2017) 5: 16; Krishna, S., et al., *Front Immunology* (2013) 4:178; Jing, W. et al., *Cancer Research* (2017) 77: 5676-5686).

Остается потребность в соединениях, применимых в качестве ингибиторов одной или обеих DGK α и DGK ζ . Кроме того, остается потребность в соединениях, применимых в качестве ингибиторов одной или обеих DGK α и DGK ζ , обладающих селективностью по сравнению с другими диацилглицеролкиназами, протеинкиназами и/или другими липидкиназами.

Соответственно, агент, который является безопасным и эффективным для восстановления активации Т-клеток, снижения антигенного порога, усиления противоопухолевого действия и/или преодоления супрессивных эффектов одной или нескольких эндогенных иммунных контрольных точек, таких как PD-1, LAG-3 и TGF β ,

будет важным дополнением к лечению пациентов с пролиферативными нарушениями, такими как рак, а также вирусными инфекциями.

Краткое описание изобретения

Заявители обнаружили соединения, обладающие активностью в качестве ингибиторов одной или обеих DGK α и DGK ζ . Кроме того, заявители обнаружили соединения, которые обладают активностью в качестве ингибиторов одной или обеих DGK α и DGK ζ , и обладают селективностью по сравнению с другими диацилглицеролкиназами, протеинкиназами и/или другими липидкиназами. Эти соединения предназначены для применения в качестве фармацевтических препаратов с желаемой стабильностью, биодоступностью, терапевтическим индексом и значениями токсичности, которые являются важными для их лекарственной способности.

Настоящее изобретение обеспечивает замещенные соединения хиназолинила формулы (I), которые можно применять в качестве ингибиторов DGK α , DGK ζ или как DGK α , так и DGK ζ , включая их соли и пролекарства.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения заболевания или нарушения, связанного с активностью DGK α , DGK ζ , или как DGK α , так и DGK ζ , включающий введение пациенту-млекопитающему соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение также предлагает способы и промежуточные соединения для получения соединений формулы (I) и/или их солей.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии.

Настоящее изобретение также относится к применению соединений формулы (I) и/или их фармацевтически приемлемых солей для изготовления лекарственного средства для лечения пролиферативных нарушений, таких как рак и вирусные инфекции.

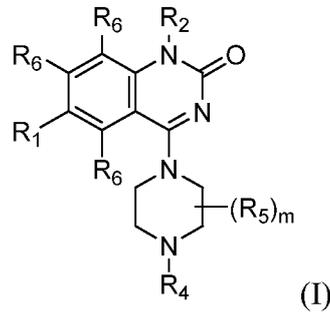
Соединения формулы (I) и композиции, содержащие соединения формулы (I), можно применять для лечения, предупреждения или лечения вирусных инфекций и различных пролиферативных нарушений, таких как рак. Фармацевтические

композиции, содержащие эти соединения, можно применять для лечения, предупреждения или замедления прогрессирования заболеваний или нарушений в различных терапевтических областях, таких как вирусные инфекции и рак.

Эти и другие признаки изобретения будут изложены в расширенной форме по мере продолжения раскрытия.

Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предлагается по меньшей мере одно соединение формулы (I):



или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-\text{CN}$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-4 R_{1a} , $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}_e$ или $-\text{P}(\text{O})\text{R}_e\text{R}_e$;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ или $-\text{NR}_a\text{R}_a$;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1-3} алкил;

каждый R_e независимо представляет собой C_{3-4} циклоалкил или C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} ;

R_2 представляет собой H, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{2a} , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_{2a} , или C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_{2a} ;

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкил), C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_4 представляет собой $-\text{CH}_2\text{R}_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CHR}_{4a}\text{R}_{4d}$, $-\text{CHR}_{4a}\text{R}_{4b}$ или $-\text{CR}_{4a}\text{R}_{4b}\text{R}_{4c}$;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_e$ или $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2\text{R}_e$;
- (ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероцикл, фенил или гетероарил, каждый из которых

замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -CN, -OH, C₁₋₆ алкила, C₁₋₃ фторалкила, C₁₋₄ гидроксиалкила, -(CH₂)₁₋₂O(C₁₋₃ алкила), C₁₋₄ алкокси, -O(C₁₋₄ гидроксиалкила), -O(CH)₁₋₃O(C₁₋₃ алкила), C₁₋₃ фторалкокси, -O(CH)₁₋₃NR_cR_c, -OCH₂CH=CH₂, -OCH₂C≡CH, -C(O)(C₁₋₄ алкила), -C(O)OH, -C(O)O(C₁₋₄ алкила), -NR_cR_c, -NR_aS(O)₂(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)O(C₁₋₄ алкила), -P(O)(C₁₋₃ алкила)₂, -S(O)₂(C₁₋₃ алкила), -O(CH₂)₁₋₂(C₃₋₆ циклоалкила), -O(CH₂)₁₋₂(морфолинила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d; или

(iii) C₁₋₄ алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C₃₋₆ циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C₁₋₆ алкила, C₁₋₃ фторалкила, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₃ фторалкокси, -OCH₂CH=CH₂, -OCH₂C≡CH, -NR_cR_c, -NR_aS(O)₂(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)(C₁₋₃ алкила), -NR_aC(O)O(C₁₋₄ алкила) и C₃₋₆ циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C₃₋₆ циклоалкил или членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, -OH, -CN, C₁₋₆ алкил, C₁₋₃ фторалкил, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₃ фторалкокси, -OCH₂CH=CH₂, -OCH₂C≡CH, -NR_cR_c или циклическую группу, выбранную из C₃₋₆ циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C₁₋₆ алкила, C₁₋₃ фторалкила, C₁₋₃ алкокси, C₁₋₃ фторалкокси и -NR_cR_c;

R_{4c} представляет собой C₁₋₆ алкил или C₃₋₆ циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, -OH, C₁₋₂ алкокси, C₁₋₂ фторалкокси и -CN;

R_{4d} представляет собой -OCH₃;

каждый R_c независимо представляет собой H или C₁₋₂ алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, -CN, -CH₃ и -OCH₃;

каждый R_5 независимо представляет собой F, Cl, -CN, -OH, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-4 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил), или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют =O;

каждый R_g независимо представляет собой F, Cl, -CN, -OH, C_{1-3} алкокси, C_{1-3}

фторалкокси, $-O(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкил), C_{3-5} циклоалкил или $-NR_cR_c$;

каждый R_6 представляет собой H, F, Cl, -CN, $-CH_3$, $-CH_2F$, $-CHF_2$, $-CF_3$ или $-OCH_3$;

m равно 0, 1, 2 или 3; и

n равно 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, -CN, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , циклопропил, замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-C(O)NR_aR_a$, $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ или $-P(O)(CH_3)_2$; каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl или -CN; каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1-3} алкил; R_2 представляет собой H, C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} , или C_{2-3} алкенил, замещенный 0-2 R_{2a} ; каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, -CN, -OH, $-O(C_{1-2}$ алкил), циклопропил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил; R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой: (i) C_{1-4} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, -CN, -OH, $-OCH_3$, $-SCH_3$, C_{1-3} фторалкокси и $-NR_aR_a$; (ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -CN, -OH, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, $-CH_2OH$, $-(CH_2)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-O(C_{1-4}$ гидроксиалкила), $-O(CH)_{1-2}O(C_{1-2}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-O(CH)_{1-2}NR_cR_c$, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-C(O)(C_{1-4}$ алкила), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила), $-P(O)(C_{1-2}$ алкила) $_2$, $-S(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-O(CH_2)_{1-2}(C_{3-4}$ циклоалкила), $-O(CH_2)_{1-2}$ (морфолинила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-

бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиридила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_a ; или (iii) C_{1-3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, фенила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-3} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила) и C_{3-4} циклоалкила; или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 Rf, каждый Rf независимо представляет собой F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-4} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-4} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-NR_cR_c$; R_{4c} представляет собой C_{1-4} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, -OH, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и -CN; каждый R_5 независимо представляет собой F, -CN, -OH, C_{1-5} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{1-2} алкокси, замещенный 0-3 R_g , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-3 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-3 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил), или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют =O; каждый R_6 представляет собой H, F или $-CH_3$; и m равно нулю, 1, 2 или 3.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где: R_1 представляет собой H, F, -CN или $-OCH_3$; R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2CH_2F$ или $-CH_2CH=CH_2$; R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CHR_{4a}R_{4b}$; R_{4a} представляет собой фенил, нафталинил или индолил, каждый из которых замещен 0-2 заместителями, независимо выбранными из F, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ и $-OCH_3$; R_{4b} представляет собой фенил или фторфенил; каждый R_5 представляет собой $-CH_3$, или

два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=O$; и m равно 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, -CN, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , циклопропил, замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-C(O)NR_aR_a$, $-NR_aR_a$, $-S(O)_nCH_3$ или $-P(O)(CH_3)_2$. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, -CN, $-CH_3$, $-CHF_2$, $-CF_3$, циклопропил или $-OCH_3$. Также в этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, F, -CN или $-OCH_3$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_2 представляет собой H, C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} , или C_{2-3} алкенил, замещенный 0-2 R_{2a} . В этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2CH_2F$ или $-CH_2CH=CH_2$. В этот вариант также включены соединения, в которых R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$ или $-CH_2CH_2F$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CH_2CH_2R_{4a}$. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CD_2R_{4a}$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_4 представляет собой $-CD_2R_{4a}$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$ или $-CR_{4a}R_{4b}R_{4c}$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CHR_{4a}R_{4b}$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой $-CH_2R_{4a}$ или $-CHR_{4a}R_{4b}$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 1, 2 или 3; и каждый R_5 независимо представляет собой F, -CN, -OH, C_{1-5} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{1-2} алкокси, замещенный 0-3 R_g , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4

R_g , фенил, замещенный 0-3 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-3 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероцикл, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил), или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=O$. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых каждый R_5 независимо представляет собой F, $-CN$, $-OH$, C_{1-2} алкил, замещенный 0-3 R_g , C_{1-2} алкокси, замещенный 0-3 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-2 R_g , $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-2}$ алкил) или $-C(O)NR_aR_a$, или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=O$. В этот вариант также включены соединения, в которых каждый R_5 представляет собой $-CH_3$, или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=O$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 2, и два R_5 присоединены к одному и тому же атому углерода с образованием $=O$.

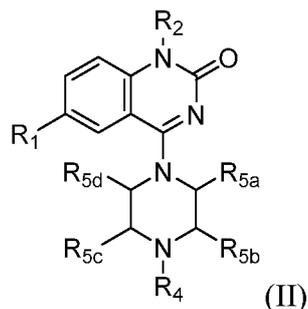
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно нулю.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 1, 2 или 3. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых m равно 1 или 2. В этот вариант также включены соединения, в которых m равно 1.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 2 или 3. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых m равно 2.

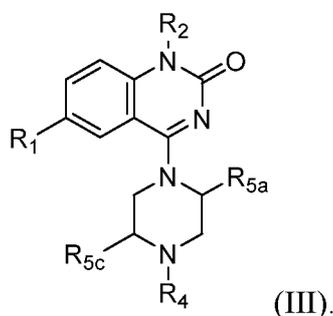
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где m равно 3.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, имеющее структуру формулы (II):



где каждый из одного, двух или трех из R_{5a} , R_{5b} , R_{5c} и R_{5d} представляет собой R_5 , и каждый из остальных R_{5a} , R_{5b} , R_{5c} и R_{5d} представляет собой водород. В этот вариант осуществления включены соединения, в которых каждый R_5 независимо представляет собой $-\text{CN}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{F}$, $-\text{CF}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{циклопропил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{циклопропил})$, циклопропил, фенил, метилоксадиазолил или метилпиридинил.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, имеющее структуру формулы (III):



В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_3$, и R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_3$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_3$, и R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}_3$.

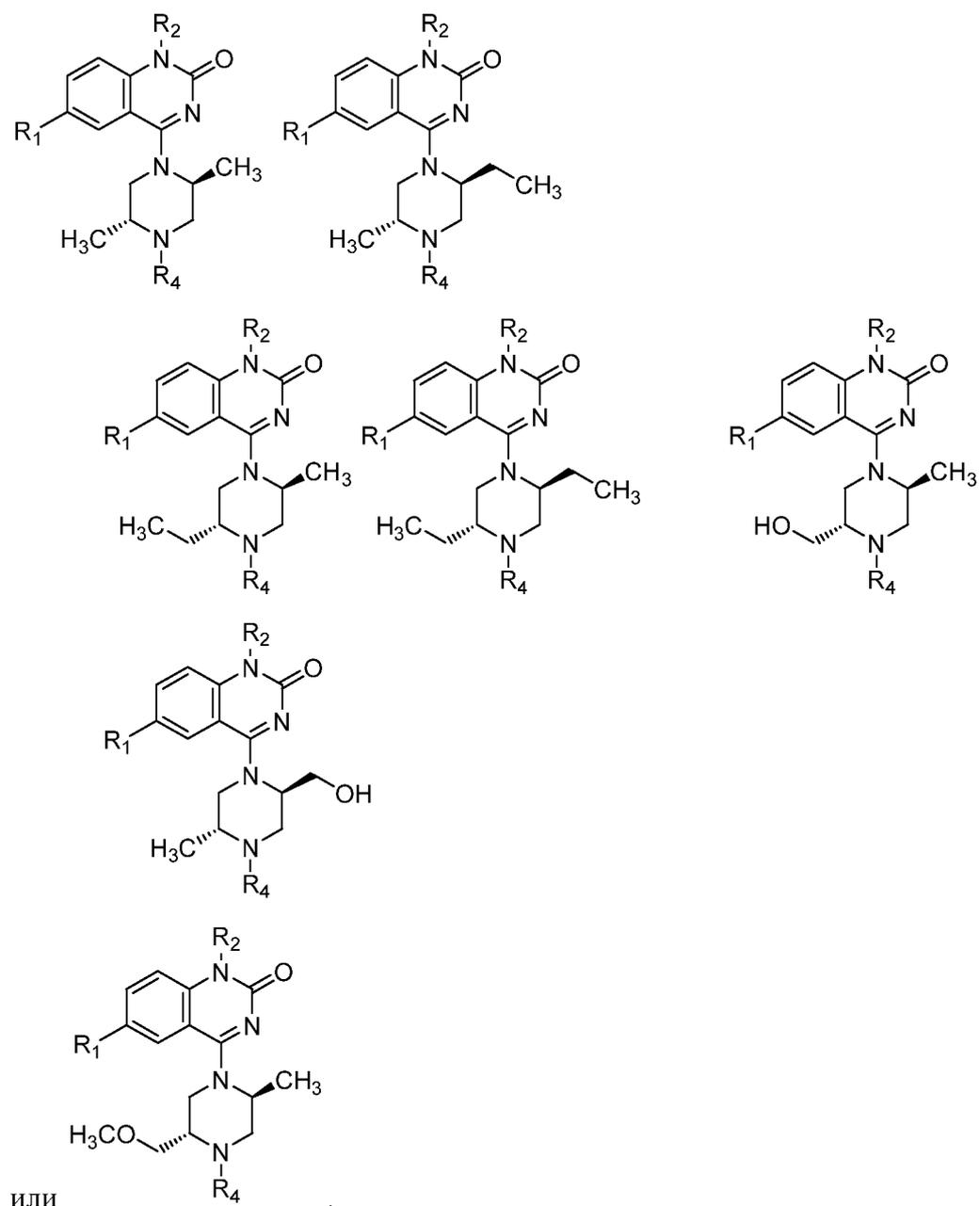
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, и R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_3$.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, и R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}_3$.

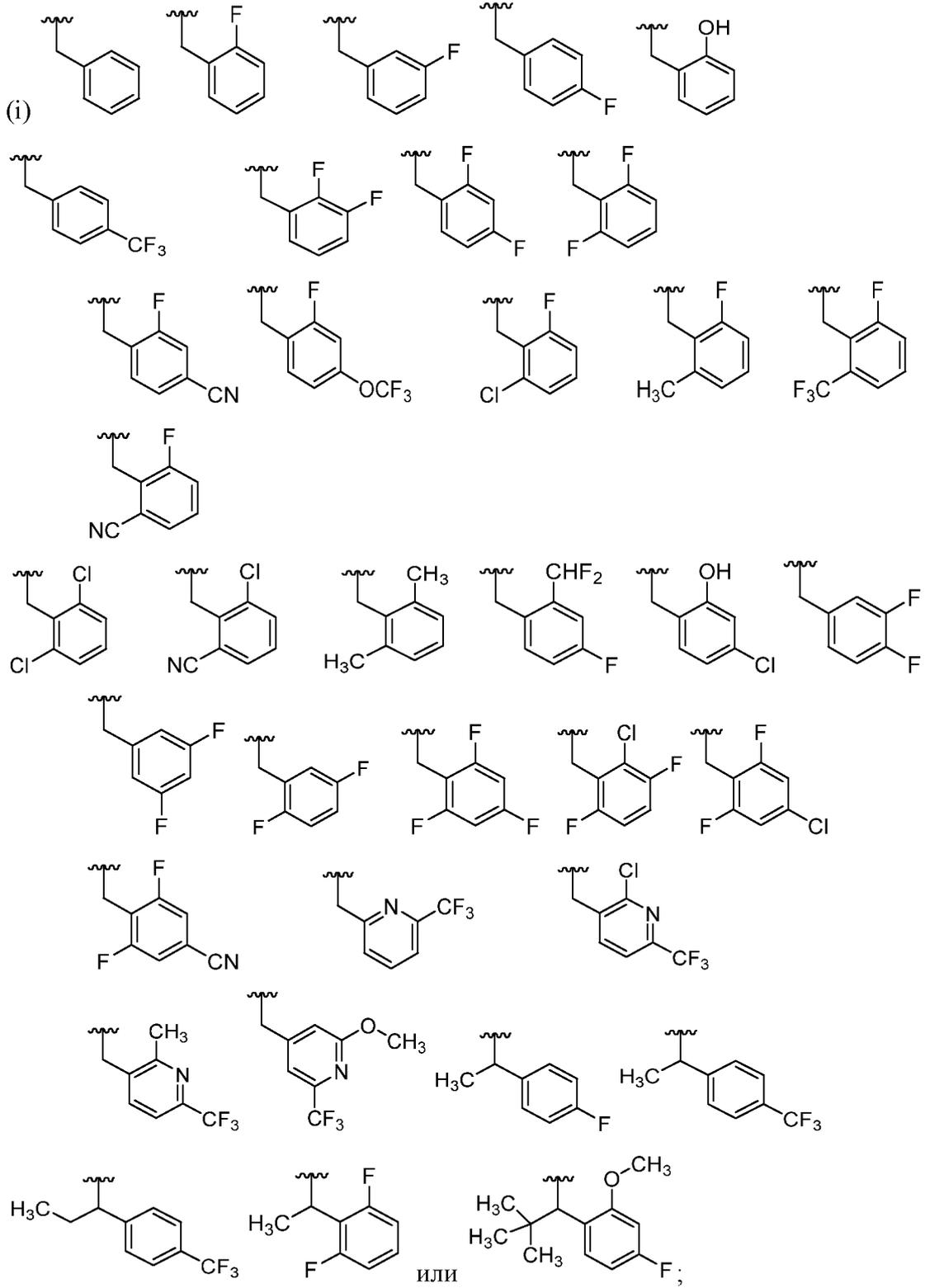
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-\text{CH}_3$, и R_{5c} представляет собой $-\text{CH}_2\text{OH}$.

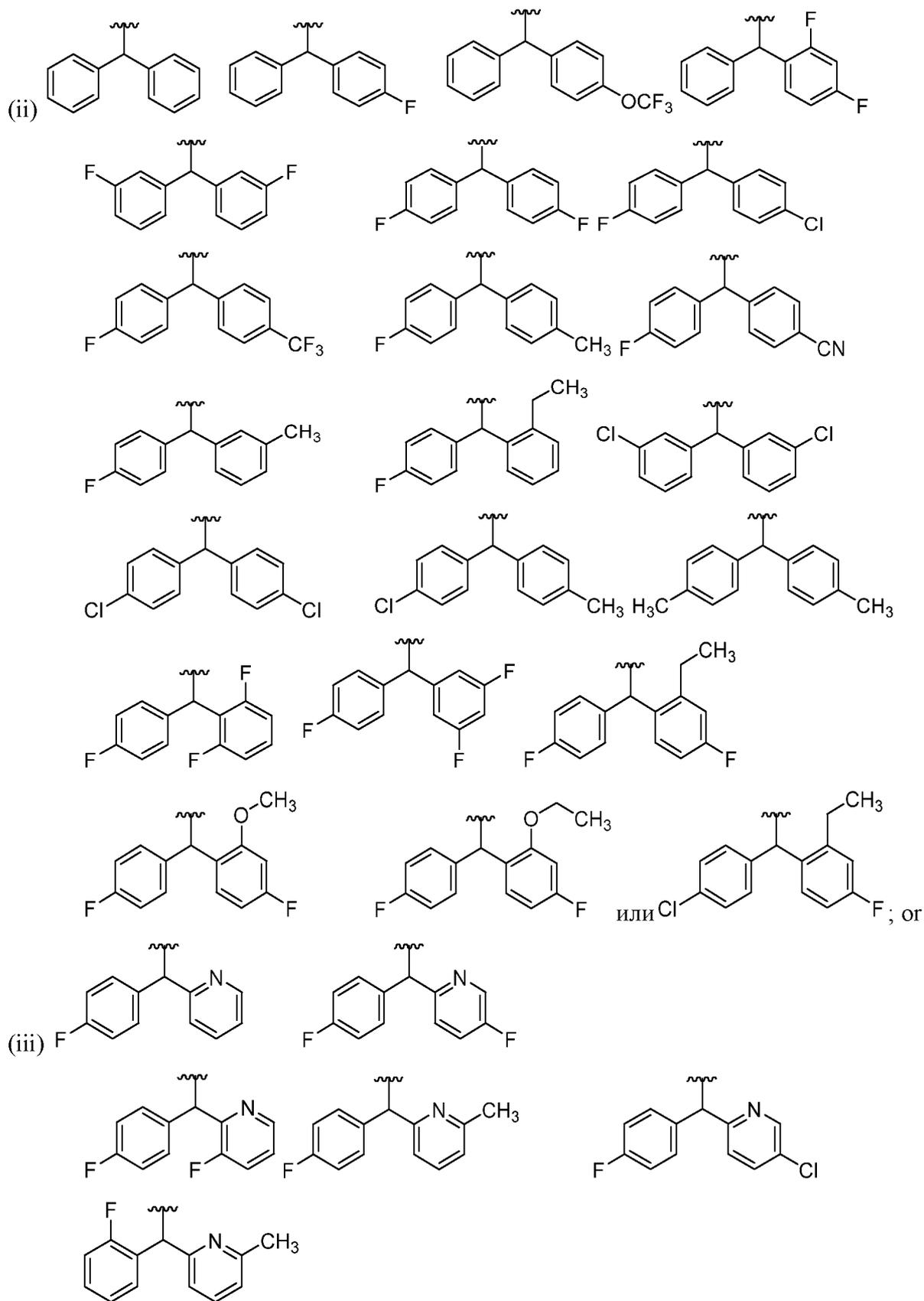
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (III) или его соль, где R_{5a} представляет собой $-CH_3$, и R_{5c} представляет собой $-CH_2OCH_3$.

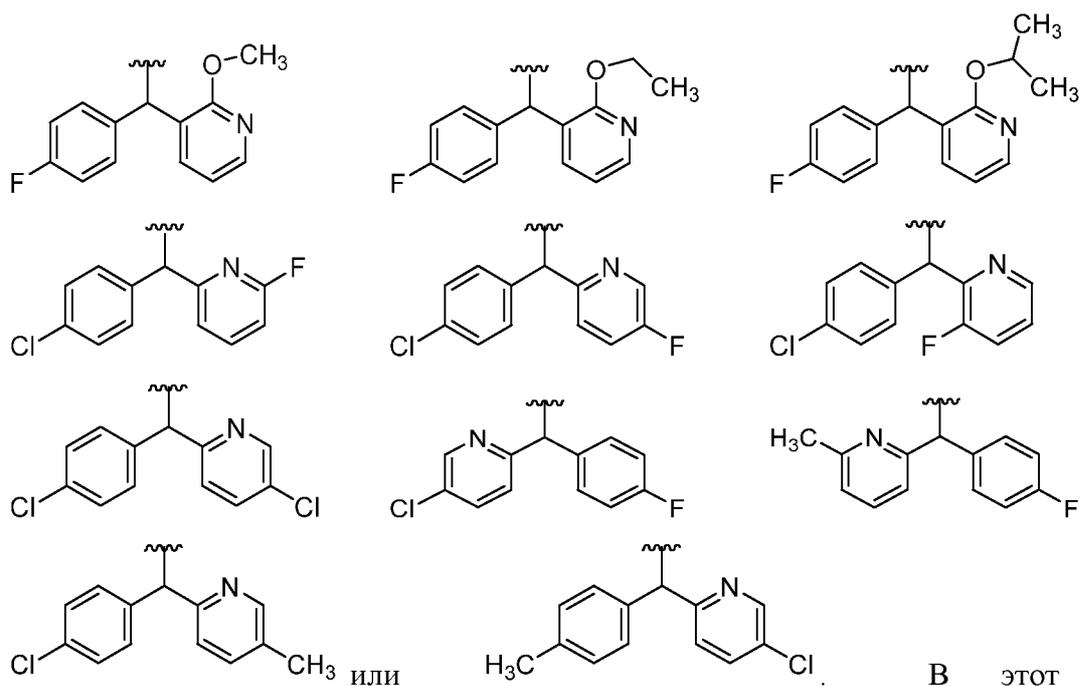
В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, имеющее структуру:



В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой:

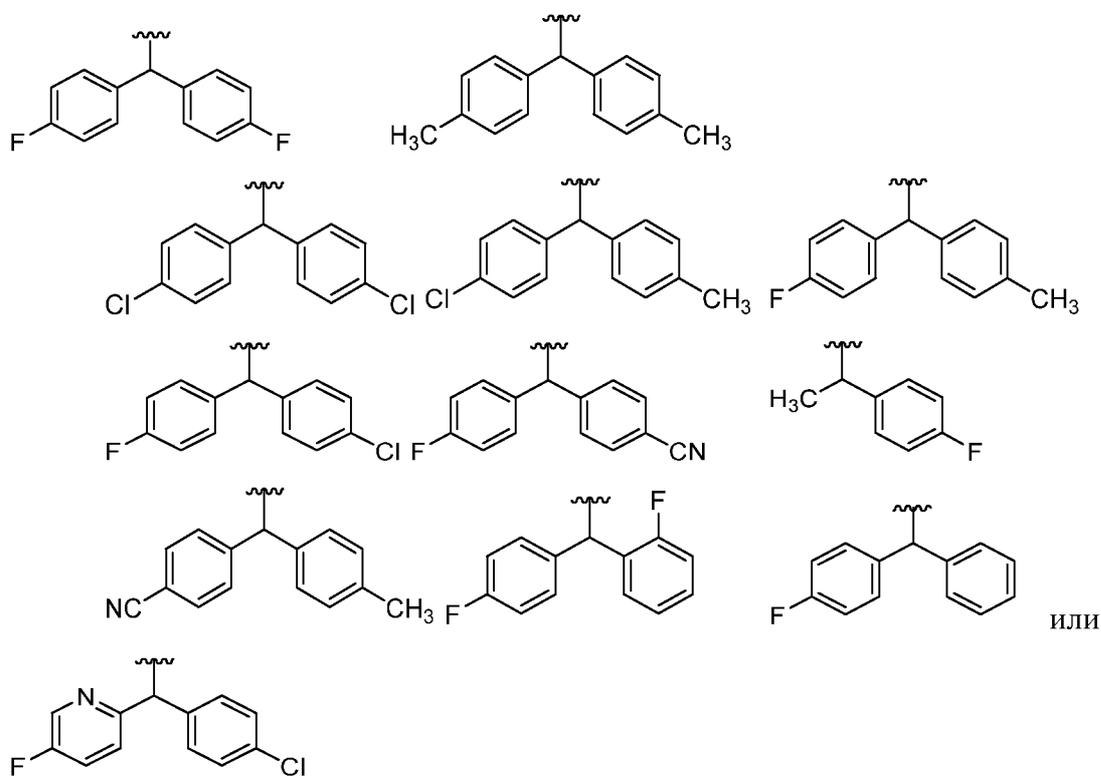






осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, Br, -CN или -OCH₃; и R_2 представляет собой -CH₃.

В одном варианте осуществления предлагается соединение формулы (I) или его соль, где R_4 представляет собой:



В этот вариант осуществления включены соединения, в которых R_1 представляет собой H, Br, -CN или -OCH₃; и R_2 представляет собой -CH₃. В этот

вариант также включены соединения, в которых R_1 представляет собой $-CN$; и R_2 представляет собой $-CH_3$.

Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не выходя за его сущность или существенные признаки. Настоящее изобретение охватывает все комбинации аспектов и/или вариантов осуществления изобретения, отмеченных в настоящем документе. Понятно, что любые и все варианты осуществления настоящего изобретения могут быть взяты в сочетании с любым другим вариантом или вариантами осуществления для описания дополнительных вариантов осуществления. Также следует понимать, что каждый отдельный элемент вариантов осуществления может быть объединен с любыми и всеми другими элементами любого варианта осуществления для описания дополнительного варианта осуществления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Признаки и преимущества изобретения могут быть легче поняты специалистами в данной области техники после прочтения следующего подробного описания. Следует принимать во внимание, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны выше и ниже в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть комбинированы с получением одного варианта осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть комбинированы с получением их подкомбинаций. Варианты осуществления, определенные в настоящем документе как иллюстративные или предпочтительные, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения.

Если здесь специально не указано иное, ссылки, сделанные в единственном числе, могут также включать множественное число. Например, «а» и «an» могут относиться либо к одному, либо к одному или нескольким.

Используемая в настоящем документе фраза «соединения и/или их соли» относится по меньшей мере к одному соединению, по меньшей мере к одной соли соединений, или их комбинациям. Например, соединения формулы (I) и/или их соли включают соединение формулы (I); два соединения формулы (I); соль соединения формулы (I); соединение формулы (I) и одну или несколько солей соединения формулы (I); и две или более солей соединения формулы (I).

Если не указано иное, предполагается, что любой атом с ненасыщенными валентностями имеет атомы водорода, достаточные для насыщения валентностей.

Определения, изложенные в настоящем документе, имеют приоритет над определениями, изложенными в любом патенте, патентной заявке и/или публикации патентной заявки, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Ниже перечислены определения различных терминов, используемых для описания настоящего изобретения. Эти определения применяются к терминам в том виде, в каком они используются в описании (если только последние не ограничены иным образом в конкретных случаях) либо по отдельности, либо как часть большей группы.

По всему описанию группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для получения стабильных фрагментов и соединений.

В соответствии с соглашением, используемым в данной области техники,  используется в структурных формулах в настоящем документе для обозначения связи, которая является точкой присоединения фрагмента или заместителя к структуре ядра или основной цепи.

Термины «галоген» и «галоген», используемые в настоящем документе, относятся к F, Cl, Br и I.

Термин «циано» относится к группе -CN.

Термин «амино» относится к группе -NH₂.

Термин «оксо» относится к группе =O.

Используемый в настоящем документе термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим углеводородным группам с разветвленной или прямой цепью, содержащим, например, от 1 до 12 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода и от 1 до 4 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, но без ограничения, метил (Me), этил (Et), пропил (например, н-пропил и изопропил), бутил (*например*, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил) и пентил (*например*, н-пентил, изопентил, неопентил), н-гексил, 2-метилпентил, 2-этилбутил, 3-метилпентил и 4-метилпентил. Когда числа появляются в нижнем индексе после символа «C», нижний индекс более точно определяет количество атомов углерода, которое может содержать конкретная группа. Например, «C₁₋₄ алкил» обозначает алкильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от одного до четырех атомов углерода.

Термин «фторалкил», используемый в настоящем документе, предназначен для включения насыщенных алифатических углеводородных групп с разветвленной и прямой цепью, замещенных одним или несколькими атомами фтора. Например,

подразумевается, что «C₁₋₄ фторалкил» включает C₁, C₂, C₃ и C₄ алкильные группы, замещенные одним или несколькими атомами фтора. Репрезентативные примеры фторалкильных групп включают, но без ограничения, -CF₃ и -CH₂CF₃.

Термин «гидроксиалкил» включает насыщенные алкильные группы с разветвленной и прямой цепью, замещенные одной или несколькими гидроксильными группами. Например, «гидроксиалкил» включает -CH₂OH, -CH₂CH₂OH и C₁₋₄-гидроксиалкил.

Термин «алкенил» относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 12 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры таких групп включают этенил или аллил. Например, «C₂₋₆ алкенил» обозначает алкенильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от двух до шести атомов углерода.

Термин «алкинил» относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 12 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры таких групп включают этинил. Например, «C₂₋₆ алкинил» обозначает алкинильные группы с прямой и разветвленной цепью, содержащие от двух до шести атомов углерода.

Термин «циклоалкил», используемый в настоящем документе, относится к группе, полученной из неароматической моноциклической или полициклической углеводородной молекулы путем удаления одного атома водорода от атома углерода насыщенной кольцевой системы. Репрезентативные примеры циклоалкильных групп включают, но без ограничения, циклопропил, циклопентил и циклогексил. Когда числа появляются в нижнем индексе после символа «C», нижний индекс более точно определяет количество атомов углерода, которое может содержать конкретная циклоалкильная группа. Например, «C₃₋₆ циклоалкил» обозначает циклоалкильные группы с тремя-шестью атомами углерода.

Предполагается, что термин «фторциклоалкил», используемый в настоящем документе, включает циклоалкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами фтора.

Термин «алкокси», используемый в настоящем документе, относится к алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода, например, к метоксигруппе (OCH₃). Например, «C₁₋₃ алкокси» обозначает алкоксигруппы с одним-тремя атомами углерода.

Термины «фторалкокси» и «О(фторалкил)» представляют собой фторалкильную группу, как определено выше, присоединенную через кислородную связь (O). Например, подразумевается, что «C₁₋₄ фторалкокси» включает C₁, C₂, C₃ и C₄ фторалкоксигруппы.

Термины «карбоцикло», «карбоциклический» или «карбоциклил» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к циклическим группам, имеющим по меньшей мере одно насыщенное или частично насыщенное неароматическое кольцо, где все атомы всех колец представляют собой углерод. Карбоциклильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности. Таким образом, термин включает неароматические кольца, такие как, например, циклоалкильные, циклоалкенильные и циклоалкинильные кольца. Примеры бициклических карбоциклильных групп включают инданил, инденил, дигидронафталинил, тетрагидронафтенил, гексагидронафталинил, октагидронафталинил, декагидронафталинил, бициклогептанил, бициклооктанил и бициклононанил.

Используемый в настоящем документе термин «арил» относится к группе атомов, полученных из молекулы, содержащей ароматическое кольцо(а), путем удаления одного атома водорода, который связан с ароматическим кольцом(ами). Репрезентативные примеры арильных групп включают, но без ограничения, фенил и нафтил. Арильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Используемый в настоящем документе термин «бензил» относится к метильной группе, в которой один из атомов водорода заменен фенильной группой. Фенильное кольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Термин «гетероатом» относится к кислороду (O), сере (S) и азоту (N).

Термины «гетероцикло», «гетероциклил» или «гетероциклил» могут быть использованы взаимозаменяемо и относятся к циклическим группам, имеющим по меньшей мере одно насыщенное или частично насыщенное неароматическое кольцо, и где одно или несколько колец имеют по меньшей мере один гетероатом (O, S или N), при этом указанное кольцо, содержащее гетероатом, предпочтительно имеет 1-3 гетероатома, независимо выбранных из O, S и/или N. Кольцо такой группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота, при условии, что общее число гетероатомов в

каждом кольце равно четырем или менее, и дополнительно при условии, что кольцо содержит по меньшей мере один атом углерода. Атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и атомы азота могут быть необязательно кватернизованы. Гетероциклогруппа может быть присоединена к любому доступному атому азота или углерода. Гетероциклокольцо может быть незамещенным или может содержать один или несколько заместителей в зависимости от валентности.

Иллюстративные моноциклические гетероциклические группы включают пирролидинил, имидазолинил, оксазолинил, изоксазолинил, изотиазолинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, пиперазинил, 2-оксопиперазинил, 2-оксопиперидинил, 2-оксопирролодинил, 2-оксоазепинил, азепинил, 4-пиперидонил, тетрагидропиранил, морфолинил, тиаморфолинил, тиаморфолинил сульфоксид, тиаморфолинил сульфон, 1,3-диоксолан, тетрагидро-1,1-диоксотииенил, дигидроизоиндолил и тетрагидрохинолинил.

Термин «гетероарил» относится к замещенным и незамещенным ароматическим 5- или 6-членным моноциклическим группам и 9- или 10-членным бициклическим группам, которые содержат по меньшей мере один гетероатом (O, S или N) по меньшей мере в одном из колец, при этом указанное содержащее гетероатом кольцо предпочтительно имеет 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из O, S и/или N. Каждое кольцо гетероарильной группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее количество гетероатомов в каждом кольце равно четырем или менее, и каждое кольцо имеет по меньшей мере один атом углерода. Конденсированные кольца, завершающие бициклическую группу, являются ароматическими и могут содержать только атомы углерода. Атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и атомы азота могут быть необязательно кватернизованы. Бициклические гетероарильные группы должны включать только ароматические кольца. Гетероарильная группа может быть присоединена к любому доступному атому азота или углерода любого кольца. Гетероарильная кольцевая система может быть незамещенной или может содержать один или несколько заместителей.

Примеры моноциклических гетероарильных групп включают пирролил, пиразолил, пиразолинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, тиадиазолил, изотиазолил, фуранил, тиофенил, оксадиазолил, пиридинил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил и триазинил.

Примеры бициклических гетероарильных групп включают индолил, бензотиазолил, бензодиоксилил, бензоксазолил, бензотиенил, хинолинил, тетрагидроизохинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, бензопиранил, индолизинил, бензофуранил, хромонил, кумаринил, бензопиранил, циннолинил, хиноксалинил, индазолил и пирролопиридил.

Выражение «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без вызывания чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Соединения формулы (I) могут образовывать соли, которые также входят в объем настоящего изобретения. Если не указано иное, подразумевается, что ссылка на соединение по изобретению включает ссылку на одну или несколько его солей. Термин «соль(и)» обозначает кислые и/или основные соли, образованные с неорганическими и/или органическими кислотами и основаниями. Кроме того, термин «соль(и)» может включать цвиттер-ионы (внутренние соли), *например*, когда соединение формулы (I) содержит как основной фрагмент, такой как аминовое или пиридиновое или имидазольное кольцо, так и кислотный фрагмент, такой как карбоновая кислота. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые (*т.е.* нетоксичные, физиологически приемлемые) соли, такие как, например, приемлемые соли металлов и аминов, в которых катион не вносит значительного вклада в токсичность или биологическую активность соли. Однако могут быть использованы и другие соли, *например*, на стадиях выделения или очистки, которые могут применяться в процессе получения и поэтому рассматриваются в рамках объема изобретения. Соли соединений формулы (I) могут быть получены, например, путем взаимодействия соединения формулы (I) с некоторым количеством кислоты или основания, таким как эквивалентное количество, в среде, такой как среда, в которой соль осаждается, или в водной среде с последующей лиофилизацией.

Примеры кислотно-аддитивных солей включают ацетаты (например, образованные присоединением уксусной кислоты или тригалогенуксусной кислоты, например трифторуксусной кислоты), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты,

этансульфонаты, фумараты, глюкогептаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образованные реакцией с хлористоводородной кислотой), гидробромиды (образованные реакцией с бромистым водородом), гидройодиды, малеаты (образованные с малеиновой кислотой), 2-гидроксиэтансульфонаты, лактаты, метансульфонаты (образованные с метансульфоновой кислотой), 2-нафталинсульфонаты, никотинаты, нитраты, оксалаты, пектинаты, персульфаты, 3-фенилпропионаты, фосфаты, пикраты, пивалаты, пропионаты, салицилаты, сукцинаты, сульфаты (например, образованные реакцией с серной кислотой), сульфонаты (например, упомянутые в настоящем документе), тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты, такие как тозилаты, ундеканоаты и т.п.

Примеры основных солей включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия, лития и калия; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли бария, цинка и алюминия; соли с органическими основаниями (например, органическими аминами), такими как триалкиламины, такие как триэтиламин, прокаин, дибензиламин, N-бензил-β-фенетиламин, 1-эфенамин, N,N'-дибензилэтилендиамин, дегидроабиетиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, дициклогексиламин или подобные фармацевтически приемлемые амины, и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.п. Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы с помощью таких агентов, как низшие алкилгалогениды (*например*, метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, бромиды и йодиды), диалкилсульфаты (*например*, диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфаты), длинноцепочечные галогениды (*например*, децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и йодиды), аралкилгалогениды (*например*, бензил- и фенетилбромиды) и другие. Предпочтительные соли включают моногидрохлориды, гидросульфаты, метансульфонаты, фосфаты или нитраты.

Соединения формулы (I) могут быть представлены в виде аморфных твердых веществ или кристаллических твердых веществ. Лиофилизацию можно использовать для получения соединений формулы (I) в виде твердого вещества.

Кроме того, следует понимать, что сольваты (например, гидраты) соединений формулы (I) также входят в объем настоящего изобретения. Термин «сольват» означает физическую ассоциацию соединения формулы (I) с одной или несколькими молекулами растворителя, органического или неорганического. Эта физическая ассоциация включает связывание водорода. В некоторых случаях сольват может быть выделен, например, когда одна или несколько молекул растворителя встроены в

кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. «Сольват» включает как сольваты в фазе раствора, так и выделяемые сольваты. Примеры сольватов включают гидраты, этаноляты, метаноляты, изопропанолаты, сольваты с ацетонитрилом и сольваты с этилацетатом. Способы сольватации известны в данной области техники.

Различные формы пролекарств известны в данной области и описаны в Rautio, J. et al., *Nature Review Drug Discovery*, 17, 559-587 (2018).

Кроме того, соединения формулы (I) после их получения могут быть выделены и очищены с получением композиции, содержащей количество по массе, равное или превышающее 99% соединения формулы (I) («практически чистое»), которое затем используют или составляют, как описано в настоящем документе. Такие «практически чистые» соединения формулы (I) также рассматриваются в настоящем документе как часть настоящего изобретения.

«Стабильное соединение» и «стабильная структура» предназначены для обозначения соединения, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси и составление в эффективный терапевтический агент. Настоящее изобретение предназначено для воплощения стабильных соединений.

«Терапевтически эффективное количество» подразумевает включение некоторого количества соединения по настоящему изобретению, взятого в отдельности, или некоторого количества комбинации заявленных соединений, или некоторого количества соединения по настоящему изобретению в комбинации с другими активными ингредиентами, эффективными для действия в качестве ингибитора DGK α и/или DGK ζ , или эффективными для лечения или предупреждения вирусных инфекций и пролиферативных нарушений, таких как рак.

Используемый в настоящем документе термин «подвергаемый лечению» или «лечение» охватывает лечение болезненного состояния у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения болезненного состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к болезненному состоянию, но еще не было диагностировано; б) ингибирование болезненного состояния, например, остановку его развития; и/или (с) облегчение болезненного состояния, например, индукцию регрессии болезненного состояния.

Предполагается, что соединения по настоящему изобретению включают все изотопы атомов, встречающихся в соединениях по настоящему изобретению. Изотопы

включают атомы, имеющие один и тот же атомный номер, но различные массовые числа. В качестве общего примера и без ограничения изотопы водорода включают дейтерий (D) и тритий (T). Изотопы углерода включают ^{13}C и ^{14}C . Меченные изотопами соединения по изобретению, как правило, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным в настоящем документе, с использованием соответствующего реагента, меченного изотопом, вместо немеченого реагента, используемого в иных случаях.

Соединения в соответствии с формулой (I) и/или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить любым способом, подходящим для состояния, подлежащего лечению, которое может зависеть от необходимости лечения в конкретном участке или количества соединения формулы (I), подлежащего доставке.

Данное изобретение также охватывает класс фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемые соли; и один или несколько нетоксичных, фармацевтически приемлемых носителей, и/или разбавителей, и/или адъювантов (обозначаемых в настоящем описании как материалы «носители») и, при желании, другие активные ингредиенты. Соединения формулы (I) можно вводить любым подходящим путем, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, адаптированной к такому пути, и в дозе, эффективной для предполагаемого лечения. Соединения и композиции по настоящему изобретению можно, например, вводить перорально, через слизистую оболочку или парентерально, включая внутрисосудистое, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное и интратермальное введение в виде стандартных дозированных форм, содержащих общепринятые фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и наполнители. Например, фармацевтический носитель может содержать смесь маннита или лактозы и микрокристаллической целлюлозы. Смесь может содержать дополнительные компоненты, такие как смазывающий агент, например, стеарат магния и дезинтегрирующий агент, такой как кросповидон. Смесь носителя может быть помещена в желатиновую капсулу или спрессована в виде таблетки. Фармацевтическую композицию можно вводить, например, в виде пероральной лекарственной формы или инфузии.

Для перорального введения фармацевтическая композиция может быть представлена в форме, например, таблетки, капсулы, жидкой капсулы, суспензии или жидкости. Фармацевтическая композиция предпочтительно изготовлена в виде дозированной единицы, содержащей определенное количество активного ингредиента.

Например, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде таблетки или капсулы, содержащей активный ингредиент в количестве в диапазоне от примерно 0,1 до 1000 мг, предпочтительно от примерно 0,25 до 250 мг и более предпочтительно от примерно 0,5 до 100 мг. Подходящая суточная доза для человека или другого млекопитающего может широко варьироваться в зависимости от состояния пациента и других факторов, но ее можно определить с помощью обычных методов.

Любая рассматриваемая в настоящем документе фармацевтическая композиция может, например, доставляться перорально посредством любых приемлемых и подходящих пероральных препаратов. Типичные пероральные препараты включают, но без ограничения, например, таблетки, пастилки, леденцы, водные и масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые и мягкие капсулы, жидкие капсулы, сиропы и эликсиры. Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального введения, могут быть приготовлены любыми способами, известными в данной области для изготовления фармацевтических композиций, предназначенных для перорального введения. Для получения фармацевтически привлекательных препаратов фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением может содержать по меньшей мере один агент, выбранный из подслащивающих агентов, ароматизаторов, окрашивающих агентов, смягчающих средств, антиоксидантов и консервантов.

Таблетку может быть, например, приготовлена путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, подходящим для изготовления таблеток. Примеры вспомогательных веществ включают, но без ограничения, например, инертные разбавители, такие как, например, карбонат кальция, карбонат натрия, лактозу, фосфат кальция и фосфат натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, кукурузный крахмал и альгиновая кислота; связующие агенты, такие как, например, крахмал, желатин, поливинилпирролидон и аравийская камедь; и смазывающие агенты, такие как, например, стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. Кроме того, таблетка может быть либо непокрытой, либо покрытой известными способами для маскировки неприятного вкуса лекарственного средства с неприятным вкусом, либо для замедления распада и всасывания активного ингредиента в желудочно-кишечном тракте, тем самым поддерживая действие активного ингредиента

в течение более длительного периода времени. Примеры водорастворимых материалов, маскирующих вкус, включают, но без ограничения, гидроксипропилметилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу. Примеры материалов с задержкой по времени включают, но без ограничения, этилцеллюлозу и бутират ацетата целлюлозы.

Твердые желатиновые капсулы могут быть, например, изготовлены путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его соли с по меньшей мере одним инертным твердым разбавителем, таким как, например, карбонат кальция; фосфат кальция; и каолин.

Мягкие желатиновые капсулы могут быть, например, изготовлены путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним водорастворимым носителем, таким как, например, полиэтиленгликоль; и по меньшей мере одной масляной средой, такой как, например, арахисовое масло, жидкий парафин и оливковое масло.

Водная суспензия может быть изготовлена, например, путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним вспомогательным веществом, подходящим для изготовления водной суспензии. Примеры вспомогательных веществ, пригодных для изготовления водной суспензии, включают, но без ограничения, например, суспендирующие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, альгиновая кислота, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие агенты, такие как, например, встречающийся в природе фосфатид, например, лецитин; продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, такими как, например, полиоксиэтиленстеарат; продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, такими как, например, гептадекаэтилен-оксицетанол; продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такие как, например, полиоксиэтилена сорбита моноолеат; и продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, такие как, например, полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водная суспензия также может содержать по меньшей мере один консервант, такой как, например, этил- и н-пропил-п-гидроксибензоат; по меньшей мере один окрашивающий агент; по меньшей мере один ароматизатор; и/или по меньшей мере

один подслащивающий агент, включая, но без ограничения, например, сахарозу, сахарин и аспартам.

Масляные суспензии могут быть, например, изготовлены путем суспендирования по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли либо в растительном масле, таком как, например, арахисовое масло; оливковое масло; кунжутное масло; и кокосовое масло; или в минеральном масле, таком как, например, жидкий парафин. Масляная суспензия также может содержать по меньшей мере один загуститель, такой как, например, пчелиный воск; твердый парафин; и цетиловый спирт. Чтобы получить приятную на вкус масляную суспензию, к масляной суспензии можно добавить по меньшей мере один из подсластителей, уже описанных выше, и/или по меньшей мере один ароматизатор. Масляная суспензия может дополнительно содержать по меньшей мере один консервант, включая, но без ограничения, например, антиоксидант, такой как, например, бутилированный гидроксианизол и альфа-токоферол.

Диспергируемые порошки и гранулы могут быть, например, изготовлены путем смешивания по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним диспергирующим и/или смачивающим агентом; по меньшей мере одним суспендирующим агентом; и/или по меньшей мере одним консервантом. Подходящие диспергирующие агенты, смачивающие агенты и суспендирующие агенты уже описаны выше. Примеры консервантов включают, но без ограничения, например, антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту. Кроме того, диспергируемые порошки и гранулы также могут содержать по меньшей мере одно вспомогательное вещество, включая, но без ограничения, например, подсластители; ароматизаторы; и окрашивающие агенты.

Эмульсия по меньшей мере одного соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одной его фармацевтически приемлемой соли может быть приготовлена, например, в виде эмульсии масло-в-воде. Масляная фаза эмульсий, содержащих соединения формулы (I), может быть составлена из известных ингредиентов известным способом. Масляная фаза может быть обеспечена с помощью, но без ограничения, например, растительного масла, такого как, например, оливковое масло и арахисовое масло; минерального масла, такого как, например, жидкий парафин; и их смесей. Хотя фаза может содержать только эмульгатор, она может включать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом, или как с жиром, так и с маслом.

Подходящие эмульгаторы включают, но без ограничения, например, встречающиеся в природе фосфатиды, например, соевый лецитин; сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, такие как, например, моноолеат сорбитана; и продукты конденсации неполных сложных эфиров с этиленоксидом, такие как, например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. Предпочтительно гидрофильный эмульгатор включают вместе с липофильным эмульгатором, который действует в качестве стабилизатора. Также предпочтительно включать как масло, так и жир. Вместе, эмульгатор(ы) со стабилизатором(ами) или без него составляют так называемый эмульгирующий воск, а воск вместе с маслом и жиром составляет так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует маслянистую дисперсную фазу составов в виде крема. Эмульсия может также содержать подсластитель, ароматизатор, консервант и/или антиоксидант. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для использования в составе по настоящему изобретению, включают Tween 60, Span 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат, лаурилсульфат натрия, глицерилдистеарат, взятый в отдельности или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области.

Соединения формулы (I) и/или по меньшей мере одна их фармацевтически приемлемая соль могут, например, также вводиться внутривенно, подкожно и/или внутримышечно в любой фармацевтически приемлемой и подходящей форме для инъекций. Примеры инъекционных форм включают, но без ограничения, например, стерильные водные растворы, содержащие приемлемые носители и растворители, такие как, например, вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия; стерильные микроэмульсии масло-в-воде; и водные или масляные суспензии.

Составы для парентерального введения могут быть в форме водных или неводных изотонических стерильных инъекционных растворов или суспензий. Эти растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков или гранул с использованием одного или нескольких носителей или разбавителей, упомянутых для применения в составах для перорального введения, или с использованием других подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Соединения могут быть растворены в воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, этаноле, кукурузном масле, хлопковом масле, арахисовом масле, кунжутном масле, бензиловом спирте, хлориде натрия, трагакантовой камеди и/или различных буферах. Другие адъюванты и способы введения хорошо и широко известны в области фармацевтики. Активный ингредиент также можно вводить путем инъекции в виде

композиции с подходящими носителями, включая физиологический раствор, декстрозу или воду, или с циклодекстрином (например, Captisol), солюбилизацией сорастворителем (например, пропиленгликолем) или мицеллярной солюбилизацией (например, Tween 80).

Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В число приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при изготовлении инъекционных препаратов.

Стерильная микроэмульсия масло-в-воде для инъекций может быть приготовлена, например, путем 1) растворения по меньшей мере одного соединения формулы (I) в масляной фазе, такой как, например, смесь соевого масла и лецитина; 2) объединение масляной фазы, содержащей соединение формулы (I), со смесью воды и глицерина; и 3) обработку комбинации с образованием микроэмульсии.

Стерильная водная или масляная суспензия может быть приготовлена в соответствии со способами, уже известными в данной области. Например, стерильный водный раствор или суспензия могут быть приготовлены с нетоксичным парентерально приемлемым разбавителем или растворителем, таким как, например, 1,3-бутандиол; и стерильная масляная суспензия может быть приготовлена со стерильным нетоксичным приемлемым растворителем или суспендирующей средой, такой как, например, стерильные нелетучие масла, например, синтетические моно- или диглицериды; и жирные кислоты, такие как, например, олеиновая кислота.

Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и наполнители, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарственного средства (SEDDS), такие как d-альфа-токоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических дозированных формах, такие как твины, полиэтиленгликоль, полиэтокселированное касторовое масло, такое как поверхностно-активное

вещество CREMOPHOR (BASF), или другие подобные полимерные матрицы для доставки, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, неполные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный кремнезем, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и ланолин. Циклодекстрины, такие как альфа-, бета- и гамма-циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксилалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропилциклодекстрины, или другие солюбилизованные производные, также могут быть успешно использованы для улучшения доставки соединений описанных в настоящем документе формул.

Фармацевтически активные соединения по данному изобретению могут быть переработаны в соответствии с общепринятыми в фармации методами с получением лекарственных средств для введения пациентам, включая людей и других млекопитающих. Фармацевтические композиции могут быть подвергнуты общепринятым фармацевтическим операциям, таким как стерилизация, и/или могут содержать общепринятые адьюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, буферы и т.д. Таблетки и пилюли могут быть дополнительно изготовлены с энтеросолюбильным покрытием. Такие композиции могут также содержать адьюванты, такие как смачивающие, подслащивающие, ароматизирующие агенты и отдушки.

Количество вводимых соединений и режим дозирования для лечения болезненного состояния с помощью соединений и/или композиций по настоящему изобретению зависят от множества факторов, включая возраст, массу тела, пол, состояние здоровья субъекта, тип заболевания, тяжесть заболевания, путь и частоту введения, а также конкретного используемого соединения. Таким образом, режим дозирования может варьироваться в широких пределах, но его можно определить рутинно с использованием стандартных методов. Подходящей может быть суточная доза от примерно 0,001 до 100 мг/кг массы тела, предпочтительно от примерно 0,0025 до примерно 50 мг/кг массы тела и наиболее предпочтительно от примерно 0,005 до 10

мг/кг массы тела. Суточную дозу можно вводить в виде одной-четырёх доз в сутки. Другие схемы дозирования включают одну дозу в неделю и одну дозу каждые два дня.

Для терапевтических целей активные соединения по настоящему изобретению обычно комбинируют с одним или несколькими адьювантами, подходящими для указанного пути введения. При пероральном введении соединения могут быть смешаны с лактозой, сахарозой, крахмальным порошком, эфирами целлюлозы и алкановых кислот, алкиловыми эфирами целлюлозы, тальком, стеариновой кислотой, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислот, желатином, аравийской камедью, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом, а затем таблетированы или инкапсулированы для удобного введения. Такие капсулы или таблетки могут содержать состав с контролируемым высвобождением, который может быть представлен в виде дисперсии активного соединения в гидроксипропилметилцеллюлозе.

Фармацевтические композиции по данному изобретению содержат по меньшей мере одно соединение формулы (I) и/или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль и необязательно дополнительный агент, выбранный из любого фармацевтически приемлемого носителя, адьюванта и наполнителя. Альтернативные композиции по данному изобретению содержат соединение формулы (I), описанное в данном документе, или его пролекарство, и фармацевтически приемлемый носитель, адьювант или наполнитель.

ПОЛЕЗНОСТЬ

Соединения формулы (I) можно применять для лечения рака.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинированному препарату соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли, его стереоизомера или таутомера и дополнительного терапевтического агента(ов) для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении и/или профилактике множества заболеваний или нарушений, связанных с ингибированием мишени DGK в Т-клетках.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего или предрасположенного к заболеванию, которое связано с ингибированием мишени DGK в Т-клетках. Можно лечить ряд заболеваний. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль, его

стереоизомер или его таутомер. Например, описанные в настоящем документе соединения можно использовать для лечения или предупреждения вирусных инфекций и пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Соединения формулы (I) и фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение формулы (I), являются полезными в лечении или предупреждении любого заболевания или состояний, которые связаны с ингибированием мишени DGK в Т-клетках. К ним относятся вирусные и другие инфекции (*например*, кожные инфекции, желудочно-кишечные инфекции, инфекции мочевыводящих путей, мочеполовые инфекции, системные инфекции) и пролиферативные заболевания (*например*, рак). Соединения формулы (I) и фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение формулы (I), можно вводить животным, предпочтительно млекопитающим (*например*, домашним животным, кошкам, собакам, мышам, крысам) и более предпочтительно людям. Для доставки соединения или фармацевтической композиции пациенту может быть использован любой способ введения. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере соединение формулы (I), вводят перорально. В других вариантах осуществления соединение формулы (I) или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере соединение формулы (I), вводят парентерально.

Соединения формулы (I) могут ингибировать активность альфа и дзета диацилглицеролкиназы (DGK α / ζ). Например, соединения формулы (I) можно использовать для ингибирования активности DGK α и DGK ζ в клетке или у индивидуума, нуждающегося в модуляции DGK α и DGK ζ , путем введения ингибирующего количества соединения формулы (I) или его соли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения заболеваний, связанных с активностью или экспрессией, включая аномальную активность и/или сверхэкспрессию, DGK α и DGK ζ у индивидуума (*например*, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы соединения формулы (I) или его фармацевтической композиции. Примеры заболеваний могут включать любое заболевание, нарушение или состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью фермента DGK α и DGK ζ , такое как избыточная экспрессия или аномальная активность. Заболевание, связанное с DGK α и DGK ζ ,

также может включать любое заболевание, нарушение или состояние, которое можно предотвратить, облегчить или вылечить путем модулирования активности ферментов DGK α и DGK ζ . Примеры заболеваний, связанных с DGK α и DGK ζ , включают рак и вирусные инфекции, такие как ВИЧ-инфекция, гепатит В и гепатит С.

В одном аспекте соединение(я) формулы (I) вводят последовательно перед введением иммуно-онкологического агента. В другом аспекте соединение(я) формулы (I) вводят одновременно с иммуно-онкологическим агентом. В еще одном аспекте соединение(я) формулы (I) вводят последовательно после введения иммуно-онкологического агента.

В другом аспекте соединения формулы (I) могут быть совместно составлены с иммуно-онкологическим агентом.

Иммуно-онкологические агенты включают, например, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело или другую биологическую или малую молекулу. Примеры биологических иммуно-онкологических агентов включают, но без ограничения, противораковые вакцины, антитела и цитокины. В одном аспекте антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте моноклональное антитело является гуманизированным или человеческим.

В одном аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой (i) агонист стимулирующего (включая костимулирующий) рецептора или (ii) антагонист ингибирующего (включая коингибирующего) сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов (часто называемых регуляторами иммунных контрольных точек).

Некоторые стимулирующие и ингибирующие молекулы являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство TNF молекул, которые связываются с родственными членами семейства рецепторов TNF, которое включает CD40 and CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR,

EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В одном аспекте Т-клеточные ответы могут быть стимулированы комбинацией соединения формулы (I) и одного или нескольких из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Другие агенты, которые можно комбинировать с соединениями формулы (I) для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на НК-клетках или агонисты активирующих рецепторов на НК-клетках. Например, соединения формулы (I) можно комбинировать с антагонистами KIR, такими как лирилумаб.

Другие агенты для комбинированной терапии включают агенты, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая, но без ограничения, антагонисты CSF-1R, такие как антагонисты антител к CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) or FPA-008 (WO11/140249; WO13/169264; WO14/036357).

В другом аспекте соединения формулы (I) могут быть использованы с одним или несколькими из агонистических агентов, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующих агентов, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистов, и одного или нескольких агентов, которые системно увеличивают частоту появления противоопухолевых Т-клеток, агентов, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют взаимодействие с ингибирующими рецепторами (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, с помощью моноклонального антитела против CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения анти-CD25 гранул *ex vivo*), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или устраняют/предотвращают анемию или истощение Т-клеток), и агентов, которые вызывают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в очагах опухоли.

В одном аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист CTLA-4, такой как антагонистическое антитело к CTLA-4. Подходящие антитела к CTLA-4 включают, например, YERVOY (ипилимумаб) или тремелимумаб.

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист PD-1, такой как антагонистическое антитело к PD-1. Подходящие антитела к PD-1 включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493). Иммуно-онкологический агент может также включать пидилизумаб (CT-011), хотя его специфичность в отношении связывания PD-1 подвергается сомнению. Другим подходом к нацеливанию на рецептор PD-1 является рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист PD-L1, такой как антагонистическое антитело к PD-L1. Подходящие антитела против PD-L1 включают, например, MPDL3280A (RG7446; WO2010/077634), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874) и MSB0010718C (WO2013/79174).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист LAG-3, такой как антагонистическое антитело к LAG-3. Подходящие антитела к LAG3 включают, например, BMS-986016 (WO10/19570, WO14/08218) или IMP-731, или IMP-321 (WO08/132601, WO09/44273).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое антитело к CD137. Подходящие антитела к CD137 включают, например, урелумаб и PF-05082566 (WO12/32433).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело к GITR. Подходящие антитела к GITR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO06/105021, WO09/009116) и МК-4166 (WO11/028683).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, BMS-986205 или NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой агонист OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают, например, MEDI-6383 или MEDI-6469.

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист OX40L, такой как антагонистическое антитело к OX40. Подходящие антагонисты OX40L включают, например, RG-7888 (WO 06/029879).

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой агонист CD40, такой как агонистическое антитело к CD40. В еще одном варианте осуществления иммуно-онкологический агент представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело к CD40. Подходящие антитела к CD40 включают, например, лукатумумаб или дацетузумаб.

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают, например, варлилумаб.

В другом аспекте иммуно-онкологический агент представляет собой MGA271 (к В7НЗ) (WO11/109400).

Комбинированная терапия предназначена для введения этих терапевтических средств последовательным образом, то есть, когда каждый терапевтический агент вводят в разное время, а также для введения этих терапевтических агентов или по меньшей мере двух терапевтических агентов по существу одновременным образом. По существу, одновременное введение может быть достигнуто, например, путем введения субъекту единичной лекарственной формы, имеющей фиксированное соотношение каждого терапевтического агента, или нескольких единичных лекарственных форм для каждого из терапевтических агентов. Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического агента можно осуществлять любым подходящим путем, включая, но без ограничения, пероральный путь, внутривенный путь, внутримышечный путь и прямое всасывание через ткани слизистой оболочки. Терапевтические агенты можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первый терапевтический агент из выбранной комбинации можно вводить путем внутривенной инъекции, в то время как другие терапевтические агенты из комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические агенты можно вводить перорально или все терапевтические агенты можно вводить путем внутривенной инъекции. Комбинированная терапия также может включать введение терапевтических агентов, как описано выше, в другой комбинации с другими биологически активными ингредиентами и немедикаментозными методами лечения (*например*, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). Если комбинированная терапия

дополнительно предусматривает немедикаментозное лечение, то указанное немедикаментозное лечение можно проводить в любое подходящее время до тех пор, пока не будет достигнут благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических агентов и немедикаментозного лечения. Например, в соответствующих случаях, благоприятный эффект все еще достигается, когда немедикаментозное лечение временно отменяется при введении терапевтических агентов, возможно, на несколько дней или даже недель.

Используемый в настоящем документе термин «клетка» относится к клетке *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка *ex vivo* может являться частью образца ткани, полученного из организма, такого как млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления клетка *in vitro* может представлять собой клетку в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления клетка *in vivo* представляет собой клетку, живущую в организме, таком как млекопитающее.

Используемый в настоящем документе термин «контактирование» относится к объединению указанных фрагментов в системе *in vitro* или системе *in vivo*. Например, «контактирование» фермента DGK α и DGK ζ с соединением формулы (I) предусматривает введение соединения по настоящему изобретению индивидууму или пациенту, такому как человек, имеющему DGK α и DGK ζ , а также, например, введение соединения формулы (I) в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий фермент DGK α и DGK ζ .

Термин «ингибитор DGK α и DGK ζ » относится к агенту, способному ингибировать активность диацилглицеролкиназы альфа и/или диацилглицеролкиназы дзета (DGK α и DGK ζ) в Т-клетках, что приводит к стимуляции Т-клеток. Ингибитор DGK α и DGK ζ может представлять собой обратимый или необратимый ингибитор DGK α и DGK ζ . «Обратимый ингибитор DGK α и DGK ζ » представляет собой соединение, которое обратимо ингибирует ферментативную активность DGK α и DGK ζ либо в каталитическом, либо в некаталитическом сайте, и «необратимый ингибитор DGK α и DGK ζ » представляет собой соединение, которое необратимо разрушает активность ферментов DGK α и DGK ζ , образуя ковалентную связь с ферментом.

Типы рака, которые можно лечить с помощью соединения формулы (I), включают, но без ограничения, рак головного мозга, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак крови, рак легких и рак костей.

Примеры таких типов рака включают нейробластому, рак кишечника, такой как рак прямой кишки, рак толстой кишки, семейную аденоматозную полипозную карциному и наследственный неполипозный колоректальный рак, рак пищевода, рак губ, рак гортани, рак гортаноглотки, рак языка, рак слюнных желез, рак желудка, аденокарциному, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, карцинома почки, паренхиматозную карциному почки, карциному яичника, карциному шейки матки, карциному тела матки, карциному эндометрия, карциному хориона, карциному поджелудочной железы, карциному предстательной железы, карциному яичка, карциному молочной железы, карциному мочевыводящих путей, меланому, опухоли головного мозга, такие как глиобластома, астроцитомы, менингиомы, медуллобластома и периферические нейроэктодермальные опухоли, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, острый лимфатический лейкоз (ALL), хронический лимфатический лейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), Т-клеточный лейкоз у взрослых, лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), гепатоцеллюлярную карциному, карциному желчного пузыря, карциному бронхов, мелкоклеточную карциному легкого, немелкоклеточную карциному легкого, множественную миелому, базалиому, тератому, ретинобластому, хориоидальную меланому, семиному, рабдомиосаркому, краниофарингиому, остеосаркому, хондросаркому, миосаркому, липосаркому, фибросаркому, саркому Юинга и плазмоцитому.

Один или несколько дополнительных фармацевтических агентов или способов лечения, таких как, например, противовирусные агенты, химиотерапевтические агенты или другие противораковые агенты, иммуностимуляторы, иммунодепрессанты, облучение, противоопухолевые и противовирусные вакцины, цитокиновая терапия (*например*, IL2 и GM-CSF), и/или ингибиторы тирозинкиназы могут быть необязательно использованы в комбинации с соединениями формулы (I) для лечения заболеваний, нарушений или состояний, связанных с DGK α и DGK ζ . Агенты можно комбинировать с соединениями по настоящему изобретению в единой лекарственной форме, или агенты можно вводить одновременно или последовательно в отдельных лекарственных формах.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты включают, например, алкилирующие агенты (включая, но без ограничения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены),

такие как урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN®), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтилен-меламин, триэтилтиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

При лечении меланомы подходящие агенты для применения в комбинации с соединениями формулы (I) включают: дакарбазин (DTIC), необязательно вместе с другими химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как кармустин (BCNU) и цисплатин; «Дартмутский режим», состоящий из DTIC, BCNU, цисплатина и тамоксифена; комбинацию цисплатина, винбластина и DTIC, темозоломида или YERVOY™. Соединения формулы (I) могут быть также комбинированы с иммунотерапевтическими лекарственными средствами, включая цитокины, такие как интерферон-альфа, интерлейкин-2 и фактор некроза опухоли (TNF), при лечении меланомы.

Соединения формулы (I) также можно применять в сочетании с вакцинной терапией при лечении меланомы. Вакцины против меланомы в некотором роде аналогичны антивирусным вакцинам, которые применяют для предотвращения заболеваний, вызываемых вирусами, таких как полиомиелит, корь и эпидемический паротит. Ослабленные клетки меланомы или части клеток меланомы, называемые антигенами, могут быть введены пациенту, чтобы стимулировать иммунную систему организма к разрушению клеток меланомы.

Меланомы, которые ограничены руками или ногами, также можно лечить с помощью комбинации агентов, включающих одно или несколько соединений формулы (I), с использованием методики гипертермической изолированной перфузии конечностей. Этот протокол лечения временно отделяет кровообращение пораженной конечности от остального тела и вводит высокие дозы химиотерапии в артерию, питающую конечность, таким образом обеспечивая высокие дозы в области опухоли, не подвергая внутренние органы воздействию этих доз, которые в противном случае могли бы вызывать тяжелые побочные эффекты. Обычно жидкость нагревают до температуры в диапазоне от 38,9°C до 40°C. Мелфалан представляет собой лекарственное средство, которое наиболее часто применяют в этой химиотерапевтической процедуре. Можно применять и другой агент, называемый фактором некроза опухоли (TNF).

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты включают, например, антиметаболиты (включая, помимо прочего, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы

аденозиндезаминазы), такие как метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты дополнительно включают, например, некоторые природные продукты и их производные (например, алкалоиды барвинка, противоопухолевые антибиотики, ферменты, лимфокины и эпиподофиллотоксины), такие как винбластин, винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, ара-С, паклитаксел (таксол), митрамицин, дезоксикоформицин, митомин-С, L-аспарагиназу, интерфероны (особенно IFN-альфа), этопозид и тенипозид.

Другие цитотоксические агенты включают навельбен, СРТ-11, анастрозол, летразол, капецитабин, релоксафин и дролоксафин.

Также подходящими являются цитотоксические агенты, такие как эпидофиллотоксин; противоопухолевый фермент; ингибитор топоизомеразы; прокарбазин; митоксантрон; координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин; модификаторы биологического ответа; ингибиторы роста; антигормональные терапевтические агенты; лейковорин; тегафур; и гемопозитические факторы роста.

Другие противораковые агенты включают терапевтические антитела, такие как трастузумаб (HERCEPTIN®), антитела к костимулирующим молекулам, таким как CTLA-4, 4-1BB и PD-1, или антитела к цитокинам (IL-10 или TGF-β).

Другие противораковые агенты также включают те, которые блокируют миграцию иммунных клеток, такие как антагонисты рецепторов хемокинов, включая CCR2 и CCR4.

Другие противораковые агенты также включают те, которые усиливают иммунную систему, такие как адъюванты или адаптивный перенос Т-клеток.

Противораковые вакцины включают дендритные клетки, синтетические пептиды, ДНК-вакцины и рекомбинантные вирусы.

Фармацевтическая композиция по изобретению может необязательно включать по меньшей мере один ингибитор сигнальной трансдукции (STI). «Ингибитор сигнальной трансдукции» представляет собой агент, который избирательно ингибирует одну или несколько жизненно важных стадий сигнальных путей в нормальной функции раковых клеток, тем самым приводя к апоптозу. Подходящие STI включают, но без ограничения: (i) ингибиторы киназы bcr/abl, такие как, например, STI 571

(GLEEVEC®); (ii) ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGF), такие как, например, ингибиторы киназы (IRESSA®, SSI-774) и антитела (Imclone: C225 [Goldstein et al., *Clin. Cancer Res.*, 1:1311-1318 (1995)], и Abgenix: ABX-EGF); (iii) ингибиторы рецепторов her-2/neu, такие как ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI), такие как, например, L-744832 (Kohl et al., *Nat. Med.*, 1(8):792-797 (1995)); (iv) ингибиторы киназ семейства Akt или пути Akt, такие как, например, рапамицин (см., например, Sekulic et al., *Cancer Res.*, 60:3504-3513 (2000)); (v) ингибиторы киназы клеточного цикла, такие как, например, флавопиридол и UCN-O1 (см., например, Sausville, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 3:47-56 (2003)); и (vi) ингибиторы фосфатидилинозитолкиназы, такие как, например, LY294002 (см., например, Vlahos et al., *J. Biol. Chem.*, 269:5241-5248 (1994)). Альтернативно, по меньшей мере один STI и по меньшей мере одно соединение формулы (I) могут находиться в отдельных фармацевтических композициях. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI можно вводить пациенту одновременно или последовательно. Другими словами, сначала можно вводить по меньшей мере одно соединение формулы (I), сначала можно вводить по меньшей мере один STI, или по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI можно вводить одновременно. Кроме того, когда применяют более одного соединения формулы (I) и/или STI, соединения можно вводить в любом порядке.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения хронической вирусной инфекции у пациента, содержащую по меньшей мере одно соединение формулы (I), необязательно, по меньшей мере одно химиотерапевтическое лекарственное средство и, необязательно, по меньшей мере одно противовирусное средство, в фармацевтически приемлемом носителе.

Также предлагается способ лечения хронической вирусной инфекции у пациента путем введения эффективного количества вышеуказанной фармацевтической композиции.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения пациенту одновременно или последовательно вводят по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один химиотерапевтический агент. Другими словами, по меньшей мере одно соединение формулы (I) может быть введено первым, по меньшей мере один химиотерапевтический агент может быть введен первым, или по меньшей мере одно соединение формулы (I) и по меньшей мере один STI могут быть

введены одновременно. Кроме того, в случае использования более одного соединения формулы (I) и/или химиотерапевтического агента, соединения можно вводить в любом порядке. Подобным образом любой противовирусный агент или STI также можно вводить в любой момент по сравнению с введением соединения формулы (I).

Хронические вирусные инфекции, которые можно лечить с помощью настоящего комбинированного лечения, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные: вирусом гепатита С (HCV), вирусом папилломы человека (HPV), цитомегаловирусом (CMV), вирусом простого герпеса (HSV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), вирусом ветряной оспы, вирусом Коксаки, вирусом иммунодефицита человека (HIV). Примечательно, что паразитарные инфекции (*например*, малярию) также можно лечить указанными выше способами, в которых соединения, известные для лечения паразитарных состояний, необязательно добавляют вместо противовирусных агентов.

Подходящие противовирусные агенты, рассматриваемые для применения в комбинации с соединением формулы (I), могут содержать нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), ингибиторы протеазы и другие противовирусные лекарственные средства.

Примеры подходящих NRTI включают зидовудин (AZT); диданозин (ddI); зальцитабин (ddC); ставудин (d4T); ламивудин (3TC); абакавир (1592U89); адефовир дипивоксил [бис(РОМ)-РМЕА]; лобукавир; BCH-I0652; эмитрицитабин [(-)-FTC]; бета-L-FD4 (также называемый бета-L-D4C или бета-L-2',3'-дидезокси-5-фторцитиден); DAPD, ((-)-бета-D-2,6-диаминопуриндиоксолан); и лоденозин (FddA). Типичные подходящие NNRTI включают невирапин (BI-RG-587); делавирадин (BHAP, U-90152); эфавиренц (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; МКС-442 (1-(этоксиметил)-5-(1-метилэтил)-6-(фенилметил)-(2,4(1H,3H)-пиримидиндион) и (+)-каланолид А (NSC-675451) и В. Типичные подходящие ингибиторы протеазы включают саквинавир (Ro 31-8959), ритонавир (ABT-538), индинавир (МК-639), нелфинавир (AG-1343), ампренавир (141W94), лазинавир, DMP-450, BMS-2322623, АВТ-378 и AG-1549. Другие противовирусные агенты включают гидроксимочевину, рибавирин, IL-2, IL-12, пентафузид и Yissum Project No.11607.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические наборы, используемые, например, для лечения или предупреждения заболеваний или нарушений, связанных с DGK α и DGK ζ , и других заболеваний, упомянутых в настоящем документе, которые включают один или несколько контейнеров,

содержащих фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество соединения формулы (I). Такие наборы могут дополнительно включать, при желании, один или несколько различных общепринятых компонентов фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры, как будет очевидно специалистам в данной области. Также, в набор могут быть включены инструкции в виде вкладышей или этикеток с указанием количества вводимых компонентов, рекомендации по применению и/или рекомендации по смешиванию компонентов.

Комбинированное лечение предполагает введение этих терапевтических агентов последовательным образом, то есть, где каждый терапевтический агент вводят в различное время, а также введение этих терапевтических агентов или по меньшей мере двух терапевтических агентов по существу одновременным образом. По существу одновременное введение можно осуществить, например, путем введения субъекту единичной лекарственной формы, имеющей фиксированную долю каждого терапевтического агента, или множества единичных лекарственных форм для каждого из терапевтических агентов. Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического агента можно осуществить любым подходящим путем, включая, но без ограничения, пероральный путь, внутривенный путь, внутримышечный путь и прямое всасывание через ткани слизистой оболочки. Терапевтические агенты можно вводить одинаковым путем или различными путями. Например, первый терапевтический агент из выбранной комбинации можно вводить путем внутривенной инъекции, тогда как другие терапевтические агенты комбинации можно вводить перорально.

Например, альтернативно все терапевтические агенты можно вводить перорально, или все терапевтические агенты можно вводить путем внутривенной инъекции. Комбинированное лечение также может включать введение терапевтических агентов, как описано выше, кроме того, в комбинации с другими биологически активными ингредиентами и немедикаментозным лечением (*например*, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). Когда комбинированное лечение, кроме того, включает немедикаментозное лечение, немедикаментозное лечение можно проводить в любое подходящее время, пока достигается благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических агентов и немедикаментозного лечения. Например, в соответствующих случаях благоприятный эффект еще достигается, когда

немедикаментозное лечение временно исключается из введения терапевтических агентов, возможно, на дни или даже недели.

Изобретение также обеспечивает фармацевтически приемлемые композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких соединений формулы (I), составленных вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями, и, необязательно, одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, описанными выше.

Соединения по данному изобретению можно вводить для любого из применений, описанных в настоящем документе, любым подходящим способом, например, перорально в форме таблеток, капсул (каждая из которых содержит составы с замедленным или пролонгированным высвобождением), пилюль, порошков, гранул, эликсиров, настоек, суспензий (включая наносуспензии, микросуспензии, высушенные распылением дисперсии), сиропы и эмульсии; сублингвально; буккально; парентерально, например, путем подкожной, внутривенной, внутримышечной или интратеральной инъекции, или методами инфузии (*например*, в виде стерильных инъекционных водных или неводных растворов или суспензий); назально, включая введение в носовые перегородки, например, с помощью ингаляционного спрея; местно, например, в форме крема или мази; или ректально, например, в форме суппозиториев. Их можно вводить отдельно, но обычно вводят с фармацевтическим носителем, выбранным на основе выбранного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», используемая в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или несущую среду, такую как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, технологическую добавку (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стериную кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части организма к другому органу или части организма. Каждый носитель должен быть «приемлемым», в смысле быть совместимым с другими ингредиентами состава, включая, *например*, адьювант, вспомогательное вещество или несущую среду, например, разбавители, консерванты, наполнители, агенты, регулирующие текучесть, дезинтегрирующие агенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, суспендирующие агенты, подсластители,

ароматизаторы, отдушки, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, смазывающие агенты и дозирующие агенты в зависимости от характера режима введения и лекарственных форм; и быть не вредным для пациента.

Термин «фармацевтическая композиция» означает композицию, содержащую соединение по изобретению в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным фармацевтически приемлемым носителем.

Фармацевтически приемлемые носители составляют в соответствии с рядом факторов, хорошо известных специалистам в данной области. Они включают, без ограничения: тип и природу составляемого активного агента; субъект, которому нужно ввести содержащую агент композицию; заданный путь введения композиции; и терапевтическое показание, на которое нацелено лечение. Фармацевтически приемлемые носители включают как водные, так и неводные жидкие среды, а также различные твердые и полутвердые лекарственные формы. Такие носители могут включать, кроме активного ингредиента, ряд различных ингредиентов и добавок, причем такие дополнительные ингредиенты включают в состав по целому ряду причин, например, для стабилизации активного агента, связующих веществ и т.д., хорошо известных специалистам в данной области. Описания подходящих фармацевтически приемлемых носителей и факторов, учитываемых при их выборе, имеются в различных легкодоступных источниках, таких как, например, Allen, L. V. Jr. *et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2 Volumes)*, 22nd Edition (2012), Pharmaceutical Press.

Режим дозирования соединений по настоящему изобретению будет, конечно, варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента и его вида и способа введения; от вида, возраста, пола, состояния здоровья, характера заболевания и массы тела реципиента; от природы и степени симптомов; от вида сопутствующего лечения; частоты лечебных процедур; способа введения, функции почек и печени пациента и от желаемого эффекта.

В качестве общего руководства, суточная пероральная доза каждого активного ингредиента, используемого для достижения указанных эффектов, будет варьироваться в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 5000 мг в сутки, предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 1000 мг в сутки и наиболее предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 250 мг в сутки. При внутривенном введении наиболее предпочтительные дозы будут находиться в диапазоне от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг/мин в течение инфузии с постоянной скоростью. Соединения по настоящему

изобретению могут быть введены в виде одноразовой суточной дозы, или общая суточная доза может быть введена в виде разделенных доз два, три или четыре раза в сутки.

Соединения обычно вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, вспомогательными веществами или носителями (обозначаемые здесь как фармацевтические носители), подходящим образом выбранными в соответствии с предполагаемой формой введения, например, пероральные таблетки, капсулы, эликсиры и сиропы, и в соответствии с обычной фармацевтической практикой.

Лекарственные формы (фармацевтические композиции), пригодные для введения, могут содержать от примерно 1 мг до примерно 2000 мг активного ингредиента на дозированную единицу. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве примерно 0,1-95% по массе в расчете на общую массу композиции.

Типичная капсула для перорального введения содержит по меньшей мере одно из соединений по настоящему изобретению (250 мг), лактозу (75 мг) и стеарат магния (15 мг). Смесь пропускают через сито 60 меш и упаковывают в желатиновые капсулы № L.

Типичный препарат для инъекций готовят в асептических условиях, помещая по меньшей мере одно из соединений по настоящему изобретению (250 мг) в ампулу, лиофилизируют в асептических условиях и плотно закрывают. С целью применения содержимое ампулы смешивают с 2 мл физиологического раствора с получением препарата для инъекций.

Настоящее изобретение включает в свой объем фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного ингредиента терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с фармацевтическим носителем. Необязательно, соединения по настоящему изобретению можно использовать отдельно, в комбинации с другими соединениями по настоящему изобретению или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, *например*, противораковым агентом или другим фармацевтически активным веществом.

Независимо от выбранного пути введения соединения по настоящему изобретению, которые могут быть использованы в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют в

фармацевтически приемлемые дозированные формы обычными способами, известными специалистам в данной области.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получать количество активного ингредиента, являющееся эффективным для достижения терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, в том числе активности конкретного применяемого соединения по настоящему изобретению или его сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции или метаболизма конкретного применяемого соединения, скорости и степени абсорбции, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретным применяемым соединением, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и медицинского анамнеза пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, хорошо известных из уровня техники в области медицины.

Врач или ветеринар, имеющие обычную квалификацию в данной области техники, могут легко определить и прописать эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать дозирование соединений по изобретению, применяемых в фармацевтической композиции в меньшем количестве, чем это требуется для достижения терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку, пока не будет достигнут желаемый эффект.

Как правило, подходящая суточная доза соединения в соответствии с изобретением будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше. Как правило, пероральные, внутривенные, интрацеребровентрикулярные и подкожные дозы соединений по данному изобретению для пациента составляют от около 0,01 до около 50 мг на килограмм массы тела в сутки. При необходимости, эффективная суточная доза активного соединения может быть введена в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более частей дозы, вводимых отдельно через соответствующие промежутки времени в течение дня, необязательно, в единичных лекарственных формах. В некоторых аспектах изобретения дозирование представляет одно введение в сутки.

Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно вводить соединение в виде фармацевтического состава (композиции). Вышеупомянутые другие терапевтические агенты при использовании в комбинации с соединениями по настоящему изобретению могут применяться, например, в количествах, указанных в Настольном справочнике врача (PDR) или, иначе, в количествах, определяемых специалистом в данной области. В способах по настоящему изобретению такой другой терапевтический агент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения соединений по изобретению.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ

Соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы с помощью многих методик, доступных специалистам в области органической химии. Общие схемы синтеза для получения соединений по настоящему изобретению описаны ниже. Эти схемы являются иллюстративными и не предназначены для ограничения возможных методик, которые специалист в данной области может использовать для получения соединений, описанных в настоящем документе. Различные способы получения соединений по настоящему изобретению будут очевидны таким специалистам в данной области. Примеры соединений по настоящему изобретению, полученных с помощью методик, описанных в общих схемах, приведены в разделе «Примеры», изложенном ниже. Получение гомохиральных соединений в примерах может быть выполнено с помощью методик, известных специалисту в данной области. Например, гомохиральные соединения могут быть получены путем разделения рацемических продуктов или диастереомеров с помощью хиральной фазовой препаративной HPLC. В качестве альтернативы, соединения по примерам могут быть получены способами, известными для получения энантиомерно или диастереомерно обогащенных продуктов.

Реакции и методики, описанные в данном разделе, осуществляют в растворителях, подходящих для используемых реагентов и материалов и подходящих для осуществляемых превращений. Кроме того, следует понимать, что в описанных ниже методах синтеза все предлагаемые условия реакций, включая выбор растворителя, реакционную атмосферу, температуру реакции, длительность эксперимента и процедуру его проведения, выбираются из условий, стандартных для данной реакции, которые должны быть понятными специалистам в данной области. Специалисту в области органического синтеза понятно, что присутствующие в

различных частях молекулы функциональные группы должны быть совместимы с предлагаемыми реагентами и реакциями. Такие ограничения в отношении заместителей, которые совместимы с условиями реакции, вполне очевидны для специалиста в данной области, при этом требуются альтернативные методы, когда присутствуют несовместимые заместители. Это иногда требует решения, чтобы изменить порядок стадий синтеза или выбрать одну конкретную схему процесса вместо другой, чтобы получить соединение по изобретению. Также следует признать, что еще одним важным соображением при планировании любого пути синтеза в этой области является разумный выбор защитной группы, используемой для защиты реакционноспособных функциональных групп, присутствующих в соединениях, описанных в данном изобретении. Авторитетным отчетом, описывающим множество альтернатив практикующему врачу, является Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, Wiley and Sons (2007).

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры иллюстрируют конкретные и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не ограничивают объем настоящего изобретения. Химические аббревиатуры и символы, а также научные сокращения и символы имеют свои обычные и общепринятые значения, если не указано иное. Дополнительные аббревиатуры, используемые в примерах и в других разделах настоящей заявки, определены выше. Общие промежуточные соединения обычно используют для получения более чем одного соединения по примерам и идентифицируются последовательно (например, промежуточное соединение 1, промежуточное соединение 2 и т.д.) и в сокращенном виде обозначаются как Int. 1 или I1, Int. 2 или I2, и т.д. Соединения по примерам идентифицируются по примеру и стадии, на которой они были получены (например, «1-A» обозначает пример 1, стадия A), или только по примеру, если соединение представляет собой соединение, указанное в заголовке примера (например, «1» обозначает соединение, указанное в заголовке примера 1). В некоторых случаях описаны альтернативные способы получения промежуточных соединений или соединений по примерам. Часто химики, квалифицированные в области синтеза, могут разработать альтернативные способы получения, которые могут быть желательными на основе одного или нескольких соображений, таких как более короткое время реакции, менее дорогостоящие исходные вещества, легкость в работе или выделении, улучшенный выход, пригодность для

катализа, исключение токсичных реагентов, доступность специализированного оборудования и уменьшенное количество линейных шагов, и т.д. Цель описания альтернативных способов получения заключается в том, чтобы дополнительно раскрыть способ получения соединений по примерам в данном изобретении. В некоторых случаях некоторые функциональные группы в представленных примерах и формуле изобретения могут быть заменены хорошо известными биоизостерическими заменами, известными в данной области техники, например, замещением группы карбоновой кислоты тетразольным или фосфатным фрагментом. Данные ^1H ЯМР, собранные в дейтерированном диметилсульфоксиде, использовали подавление сигнала воды при обработке данных. Сообщаемые спектры не скорректированы на эффекты подавления сигналов воды. Протоны, соседние с частотой подавления сигнала воды 3,35 ppm, демонстрируют пониженную интенсивность сигнала.

СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|-----------------|---|
| Ac | ацетил |
| anhyd. | безводный |
| aq. | водный |
| Boc | <i>tert</i> -бутоксикарбонил |
| BOP | бензотриазол-1-илокситрис-(диметиламино)-фосфония гексафторфосфат |
| Bu | бутил |
| CDI | карбонилдиимидазол |
| DCM | дихлорметан |
| DEA | диэтиламин |
| DIEA или DIPEA | диизопропилэтиламин |
| DMF | диметилформамид |
| DMSO | диметилсульфоксид |
| dppf | 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен |
| Et | этил |
| EtOAc | этилацетат |
| EtOH | этанол |
| h, часы или hrs | час(ы) |
| HCl | хлористоводородная кислота |
| HPLC | жидкостная хроматография высокого давления |
| LC | жидкостная хроматография |

LCMS жидкостная хроматография - масс-спектрометрия

M молярный

mM миллимолярный

Me метил

MeOH метанол

Mesy1-Cl метансульфонилхлорид

MHz мегагерц

mins минута(ы)

M⁺¹ (M+H)⁺

MS масс-спектрометрия

n или N нормальный

NH₄OAc ацетат аммония

nM наномолярный

NMP *N*-метилпирролидинон

Pd₂(dba)₃ трис-(дибензилиденацетон)дипалладий

pet ether петролейный эфир

Ph фенил

POCl₃ оксихлорид фосфора

rt или Ret time время удерживания

sat. насыщенный

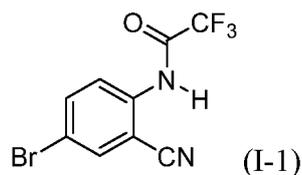
TEA триэтиламин

TFA трифторуксусная кислота

THF тетрагидрофуран

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 1

N-(4-бром-2-цианопенил)-2,2,2-трифторацетамид

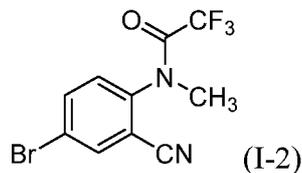


К раствору 2-амино-5-бромбензонитрила (10 г, 50,8 ммоль) в THF (200 мл) при 0°C по каплям добавляли триэтиламин (10,61 мл, 76 ммоль) и 2,2,2-трифторуксусный ангидрид (7,82 мл, 55,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной

температуре в течение 3 ч. Реакцию гасили ледяной водой. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический слой промывали водой, рассолом и сушили над сульфатом натрия. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием флэш-колонки на 24 г и 20% EtOAc в петролейном эфире. Фракции концентрировали при пониженном давлении с получением очищенного N-(4-бром-2-цианофенил)-2,2,2-трифторацетамида (8 г, выход 51,1%). LCMS: $m/z = 292.9$ (M+H)⁺; *rt* 1,19 мин (Метод LCMS: колонка: Aquity UPLC BEH C18 (3,0 x 50 мм), 1,7 мкм; подвижная фаза А: 10 мМ NH₄OAc:ACN (95:5); подвижная фаза В: 10 мМ NH₄OAc:ацетонитрил (5:95). Описание: метод: %В: 0 мин-20 : 2 мин-100 : 2,3 мин-100, скорость потока: 0,7 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм). ¹H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ (ppm) 8.30-8.28 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 2H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 2

N-(4-бром-2-цианофенил)-2,2,2-трифтор-N-метилацетамид



К раствору N-(4-бром-2-цианофенил)-2,2,2-трифторацетамида (8 г, 27,3 ммоль) в ДМФ (25 мл) при комнатной температуре добавляли карбонат калия (9,43 г, 68,2 ммоль) с последующим метилиодидом (8,54 мл, 136 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили водой и экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический слой промывали водой, рассолом и сушили над сульфатом натрия. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением N-(4-бром-2-цианофенил)-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (6 г, выход 71,6%). LCMS: $m/z = 213.0$ (M-COCF₃+H)⁺; *rt* 1,57 мин (колонка: Aquitey UPLC BEH C18 (3,0 x 50 мм), 1,7 мкм; подвижная фаза А: 10 мМ NH₄OAc:ACN (95:5); подвижная фаза В: 10 мМ NH₄OAc:ACN (5:95). Описание: метод: %В: 0 мин-20 : 2 мин-100 : 2,3 мин-100, скорость потока: 0,7 мл/мин.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 3

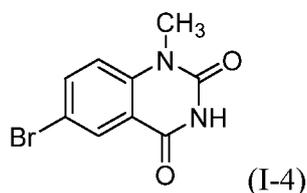
5-бром-2-(метиламино)бензамид



К раствору N-(4-бром-2-цианофенил)-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (8 г, 26,1 ммоль) в смеси DMSO (80 мл)/вода (40 мл) при 0°C по каплям добавляли K₂CO₃ (7,2 г, 52,1 ммоль) с последующим пероксидом водорода (37%, 10,73 мл, 105 ммоль) в течение 10 минут. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов и затем гасили ледяной водой. Твердые вещества отделяли фильтрованием, промывали водой и сушили при пониженном давлении с получением 5-бром-2-(метиламино)бензамида (4 г, выход 59,0%). LCMS: $m/z = 229.1$ (M+H)⁺; *rt* 1,14 мин; подвижная фаза А: 10 mM NH₄OAc:ACN (95:5); подвижная фаза В: 10 mM NH₄OAc:ACN (5:95). Метод: %В: 0 мин-20% : 1,1 мин-90% : 1,7 мин-90%; колонка: Aquity UPLC BEH 18 (3,0 x 50 мм) 1,7 мкм, скорость потока: 0,7 мл/мин.

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 4

6-Бром-1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-дион



К раствору 5-бром-2-(метиламино)бензамида (4 г, 17,46 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (40 мл) добавляли NaN (1,379 г, 34,9 ммоль, 60% масс./масс.) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляли раствор CDI (4,25 г, 26,2 ммоль) в диметилформамиде (5 мл) и реакционную смесь нагревали при 70°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Твердый продукт отделяли фильтрованием, промывали водой и сушили при пониженном давлении с получением 6-бром-1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона (3 г, выход 67,4%). LCMS: $m/z = 255.0$ (M+H); время удерживания 0,91 мин (Колонка: Aquity UPLC BEH C18 (3,0 x 50 мм), 1,7 мкм; подвижная фаза А: 10 mM NH₄OAc:ACN (95:5); подвижная фаза В: 10 mM NH₄OAc:ACN (5:95). Метод: %В: 0 мин-20 : 2 мин-100 : 2,3 мин - 100, скорость потока: 0,7 мл/мин). ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ

(ppm) 11.70 (br s, 1H), 8.04 (d, $J=2.4$ Гц, 1H), 7.91 (dd, $J=8.8, 2.4$ Гц, 1H), 7.40 (d, $J=9.0$ Гц, 1H), 3.43 (s, 3H).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 5

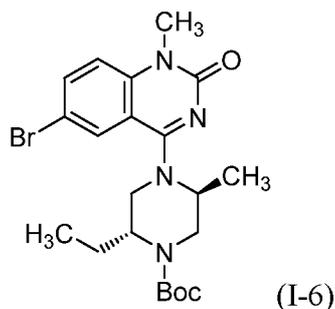
6-Бром-4-хлор-1-метилхиназолин-2(1H)-он



К суспензии 6-бром-1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона (1 г, 3,92 ммоль) в сухом толуоле (30 мл) добавляли DIPEA (1,712 мл, 9,80 ммоль) и POCl_3 (1,827 мл, 19,60 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 6-бром-4-хлор-1-метилхиназолин-2(1H)-она (1 г, выход 41,0%). LCMS: $m/z = 273.0$ ($\text{M}+\text{H}^+$); rt 1,71 мин (Метод LCMS: колонка Kinetex XB-C18 (75 X 3 мм, 2,6 мкм); подвижная фаза А: 10 mM NH_4COOH в воде:ACN (98:2); подвижная фаза В: 10 mM NH_4COOH в воде:ACN (2:98).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 6

трет-бутил-(2R,5S)-4-(6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилат

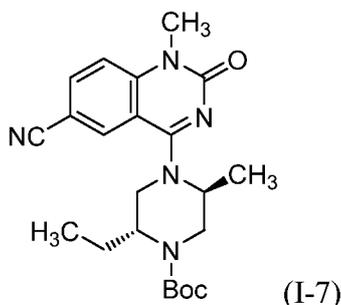


К перемешиваемому раствору трет-бутил-(2R,5S)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилата (CAS# 2165403-17-6) (1 г, 3,48 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) добавляли DIPEA (6,08 мл, 34,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. К реакционной смеси добавляли 6-бром-4-хлор-1-метилхиназолин-2(1H)-он (0,952 г, 3,48 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (60-70%

EtOAc/петролейный эфир; колонка 40 г) с получением трет-бутил (2R,5S)-4-(6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилата (0,8 г, 33,6%). LCMS: $m/z = 467.2$ (M+H); rt 1,74 мин. Метод LCMS: колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 мм) 1,7 мкм; подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония:ацетонитрил (95:5); подвижная фаза В: 10 mM ацетат аммония:ацетонитрил (5:95), градиент = 20% В в течение 1,1 мин, затем удерживание в течение 2,2 мин при 100% В; температуре: 50°C; скорость потока: 0,7 мл/мин; обнаружение: УФ при 110 нм).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 7

трет-бутил-(2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилат

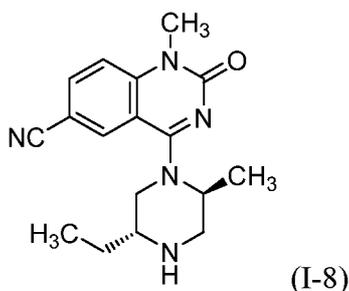


К перемешиваемому раствору трет-бутил-(2R,5S)-4-(6-бром-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилата (0,3 г, 0,645 ммоль) в NMP (2 мл), добавляли цианид цинка (0,151 г, 1,289 ммоль) и цинк (0,042 г, 0,645 ммоль). Реакционную смесь дегазировали в течение 5 мин, затем добавляли Pd₂(dba)₃ (0,059 г, 0,064 ммоль), dppf (0,071 г, 0,129 ммоль) и нагревали при 90°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом и фильтровали через слой целита. Фильтрат промывали водой, рассолом и органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения. Неочищенное соединение очищали хроматографией на силикагеле (70-80% EtOAc/петролейный эфир; колонка 24 г) с получением трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилата (0,23 г, выход 63,3%). Метод LCMS: колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 мм) 1,7 мкм, подвижная фаза А: 10 mM пцетат аммония:ацетонитрил (95:5); подвижная фаза В: 10 mM пцетат аммония:ацетонитрил (5:95), градиент = 20% В в течение 1,1 мин, затем удерживание в

течение 2,2 мин при 100% В; температура: 50°C; скорость потока: 0,7 мл/мин; обнаружение: УФ при 110 нм).

ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 8

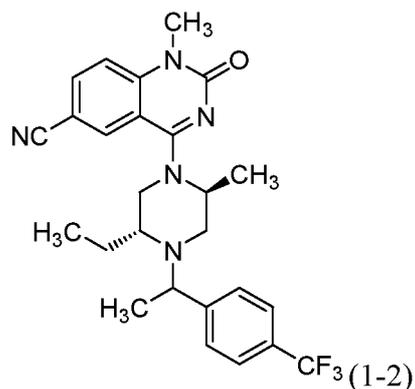
4-((2S,5R)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-6-карбонитрил



К перемешиваемому раствору трет-бутил (2R,5S)-4-(6-циано-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-4-ил)-2-этил-5-метилпиперазин-1-карбоксилата (0,1 г, 0,243 ммоль) в сухом DCM (5 мл) добавляли TFA (0,281 мл, 3,65 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 4-((2S,5R)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-6-карбонитрила, TFA (0,1 г, 0,202 ммоль, выход 83%). LCMS: $m/z = 312.2$ (M+H)⁺; *rt* 0,68 мин. Метод LCMS: колонка: Waters Acquity UPLC ВЕН C18 (2,1 x 50 мм) 1,7 мкм, подвижная фаза А: 10 мМ ацетат аммония:ацетонитрил (95:5); подвижная фаза В: 10 мМ ацетат аммония:ацетонитрил (5:95), градиент = 20% В в течение 1,1 мин, затем удерживание в течение 2,2 минут при 100% В; температура: 50°C; скорость потока: 0,7 мл/мин; обнаружение: УФ при 110 нм).

ПРИМЕРЫ 1 И 2

4-((2S,5R)-5-этил-2-метил-4-(1-(4-(трифторметил)фенил)этил)пиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-6-карбонитрил



К раствору 4-((2S,5R)-5-этил-2-метилпиперазин-1-ил)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидрохиназолин-6-карбонитрила, TFA (0,2 г, 0,47 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (0,246 мл, 1,410 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 15 мин. Затем к реакционной смеси добавляли 1-(1-хлорэтил)-4-(трифторметил)бензол (0,196 г, 0,940 ммоль) (CAS-85289-90-3) и иодид натрия (0,07 г, 0,47 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (100 мл). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде смеси диастереомеров, которую очищали препаративной HPLC [метод HPLC: колонка: EVO C18 (20 X 250 мм), 5 мкм, подвижная фаза А: 10 mM бикарбонат аммония, В: ACN/MeOH, скорость потока: 20 мл, с получением пика 1 (пример 1) и пика 2 (пример 2)].

Фракцию 1 (пик 1) концентрировали при пониженном давлении, а остаток разбавляли (EtOH/H₂O, 1:5) и лиофилизировали с получением соединения по примеру 1 (6 мг, выход 2,6%); LCMS: $m/z = 484.3$ (M+H)⁺; *rt* 2,249 мин; (Метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм), 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода: 5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода: 95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-3; %В: 0-100 %). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.16 (d, J=1.7 Гц, 1H), 8.04 (dd, J=8.8, 1.7 Гц, 1H), 7.76-7.68 (m, 2H), 7.62 (d, J=8.1 Гц, 2H), 7.53 (d, J=8.8 Гц, 1H), 4.77-4.66 (m, 1H), 3.97-3.88 (m, 1H), 3.88-3.79 (m, 1H), 3.64-3.57 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.91-2.84 (m, 1H), 2.82-2.74 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 1H), 1.44 (d, J=6.6 Гц, 3H), 1.35-1.24 (m, 5H), 0.48 (t, J=7.5 Гц, 3H)

Фракцию 2 (пик 2) концентрировали при пониженном давлении, а остаток разбавляли (EtOH/H₂O 1:5) и лиофилизировали с получением соединения по примеру 2 (0,07 г, 0,144 ммоль, выход 10,27%); LCMS: $m/z = 484.3$ (M+H); *rt* 2,27 мин; (метод LCMS: колонка: XBridge BEH XP C18 (50 x 2,1 мм), 2,5 мкм; подвижная фаза А: 95% вода : 5% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; подвижная фаза В: 5% вода : 95% ацетонитрил; 10 mM ацетат аммония; скорость потока: 1,1 мл/мин; температура: 50°C; время (мин): 0-3; %В: 0-100. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 8.15 (d, J=1.7 Гц, 1H), 8.05 (dd, J=8.8, 1.7 Гц, 1H), 7.76-7.66 (m, 2H), 7.66-7.57 (m, 2H), 7.54 (d, J=9.0 Гц, 1H), 4.57-4.47 (m, 1H), 4.16 (br d, J=13.4 Гц, 1H), 3.79-3.67 (m, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.11-3.02 (m,

1H), 2.74-2.67 (m, 1H), 2.12 (dd, J=12.0, 2.0 Гц, 1H), 1.54-1.41 (m, 2H), 1.26 (dd, J=6.4, 3.4 Гц, 6H), 0.78 (t, J=7.5 Гц, 3H).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ

Фармакологические свойства соединений по данному изобретению могут быть подтверждены с помощью ряда биологических анализов. Приведенные ниже в качестве примера биологические анализы проводили с использованием соединений по изобретению.

Анализ 1: Анализ ингибирования DGK *in vitro* – Способ А

Реакции DGK α и DGK ζ проводили с использованием либо экструдированной липосомы (анализы LIPGLO DGK α и DGK ζ), либо детергент/липидного мицеллярного субстрата (анализы DGK α и DGK ζ). Реакции проводили в 50 mM MOPS pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 мкМ CaCl₂ и 1 mM DTT (аналитический буфер). Реакционные смеси с использованием детергент/липидного мицеллярного субстрата также содержали 50 mM октил В-D-глюкопиранозида. Концентрации липидного субстрата составляли 11 mM PS и 1 mM DAG для реакций детергент/липидных мицелл. Концентрации липидного субстрата составляли 2 mM PS, 0,25 mM DAG и 2,75 mM PC для реакций с экструдированными липосомами. Реакции проводили в 150 мкМ АТР. Концентрации фермента для DGK α и DGK ζ составляли 5 нМ.

Исследования соединений на ингибирование проводили следующим образом: 50 нл капель каждого тестируемого соединения (максимальная концентрация 10 mM с сериями 11 точечных, 3-кратных разведений для каждого соединения), сольубилизованных в DMSO, переносили в лунки белого 1536-луночного планшета (Corning 3725). Готовили 5 мл раствора фермент/субстрат с 2-кратной конечной концентрацией в реакционной смеси путем объединения 2,5 мл 4-кратного раствора фермента (20 нМ DGK α или DGK ζ (приготовленного, как описано ниже) в аналитическом буфере) и 2,5 мл либо 4-кратного липосомального, либо 4-кратного детергент/липидного мицеллярного раствора (составы, описанные ниже), и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в лунки, содержащие тестируемое соединение, добавляли 1 мкл 2-кратного раствора фермент/субстрат, и реакции инициировали добавлением 1 мкл 300 мкМ АТР. Реакциям давали протекать в течение 1 ч, после чего добавляли 2 мкл реагента Glo

Reagent (Promega V9101) и инкубировали в течение 40 минут. Затем добавляли 4 мкл реагента Kinase Detection Reagent и инкубировали в течение 30 минут. Люминесценцию регистрировали с помощью микропланшетного ридера EnVision. Процентное ингибирование рассчитывали по конверсии АТФ, генерируемой в реакциях без ферментативного контроля для 100% ингибирования и в реакциях только с носителем для 0% ингибирования. Соединения оценивали при 11 концентрациях для определения IC₅₀.

4x Детергент/липидный мицеллярный препарат

Детергент/липидную мицеллу получали путем объединения 15 г фосфатидилсерина (Avanti 840035P) и 1 г диацилглицерина (800811O) и растворения в 150 мл хлороформа в 2 л круглодонной колбе. Хлороформ удаляли под высоким вакуумом на роторном испарителе. Полученное бесцветное липкое масло ресуспендировали в 400 мл 50 mM MOPS pH 7,5, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 1 мкМ CaCl₂, 1 mM DTT и 200 mM октилглюкозида путем интенсивного перемешивания. Раствор липид/детергент разделяли на аликвоты по 5 мл и хранили при -80°C.

4x Липосомный препарат

Липидный состав представлял собой 5 мол.% DAG (Avanti 800811O), 40 мол.% PS (Avanti 840035P) и 55 мол.% PC (Avanti 850457) при общей концентрации липидов 15,2 мг/мл для 4-кратного раствора липосом. PC, DAG и PS растворяли в хлороформе, объединяли и сушили в вакууме до образования тонкой пленки. Липиды гидратировали до 20 mM в 50 mM MOPS, pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, и пять раз замораживали-оттаивали. Суспензию липидов экструдировали через 100-нм поликарбонатный фильтр одиннадцать раз. Для подтверждения размера липосом (радиус 50-60 нм) проводили динамическое светорассеяние. Липосомный препарат хранили при 4°C в течение четырех недель.

Бакуловирусная экспрессия DGK α и DGK ζ человека

Образцы бакуловируса человека DGK-альфа-TVMV-His-pFBgate и DGK-zeta-transcript variant-2-TVMV-His-pFBgate были созданы с использованием системы экспрессии бакуловируса Vac-to-Vac (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. ДНК, используемая для экспрессии DGK-альфа и DGK-дзета, имеет последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Амплификацию бакуловируса

проводили с использованием инфицированных клеток Sf9 при соотношении вирус/клетка 1:1500 и выращивали в течение 65 часов при 27°C после трансфекции.

Увеличение экспрессии для каждого белка проводили в системе Cellbag 50L WAVE-Bioreactor System 20/50 от GE Healthcare Bioscience. 12 л 2×10^6 клеток/мл клеток Sf9 (Expression System, Davis, CA), выращенных в среде для насекомых ESF921 (Expression System), инфицировали исходным вирусом при соотношении вирус/клетка 1:200 и выращивали в течение 66-68 часов при 27°C после заражения. Зараженную культуру клеток собирали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в центрифуге SORVALL® RC12BP. Осадки клеток хранили при -70°C до очистки.

Очистка DGK-альфа и DGK-дзета человека

Каждую экспрессированную полноразмерную DGK α и DGK ζ человека, содержащую TVMV-расщепляемую C-концевую последовательность гекса-His-метки (SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно), и полученную, как описано выше, очищали из суспензии клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Клетки лизировали методом кавитации азотом в Азотной бомбе (Parr Instruments) и лизаты осветляли центрифугированием. Осветленные лизаты очищали до ~90% гомогенности с использованием трех последовательных стадий колоночной хроматографии в системе ÄKTA Purifier Plus. Трехступенчатая колоночная хроматография включала улавливание никель-аффинной смолой (например, HisTrap FF Crude, GE Healthcare) с последующей эксклюзионной хроматографией (например, HiLoad 26/600 Superdex 200 prepgrade, GE Healthcare для DGK-альфа и HiPrep 26/600 Sephacryl S 300_HR, GE Healthcare для DGK-дзета). Третьей стадией являлась ионообменная хроматография, которая различалась для двух изоформ. DGK-альфа очищали с помощью анионообменной хроматографии на Q-Sepharose (GE Healthcare). DGK-дзета очищали с помощью катионообменной хроматографии на SP Sepharose (GE Healthcare). Белки доставляли в концентрациях ≥ 2 мг/мл. Буферы для составления были идентичными для обоих белков: 50 mM Hepes, pH 7,2, 500 mM NaCl, 10% об./об. глицерина, 1 mM TCEP и 0,5 mM EDTA.

Анализ 2: Анализ ингибирования DGK in vitro – Способ В

Реакции DGK α и DGK ζ проводили с использованием либо экстрадированной липосомы (анализы LIPGLO DGK α и DGK ζ), либо детергент/липидного мицеллярного

субстрата (анализы DGK α и DGK ζ). Реакции проводили в 50 мМ MOPS, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мкМ CaCl₂ и 1 мМ DTT (аналитический буфер). Реакции с использованием детергент/липидного мицеллярного субстрата также содержали 50 мМ октил β -D-глюкопиранозид. Концентрации липидного субстрата составляли 11 мМ PS и 1 мМ DAG для реакций мицелл детергент/липид. Концентрации липидного субстрата составляли 2 мМ PS, 0,25 мМ DAG и 2,75 мМ PC для реакций с экстрадированными липосомами (общий липид 5 мМ). Реакции проводили в 150 мкМ АТФ. Концентрации фермента для DGK α и DGK ζ составляли 5 нМ.

Исследования соединений на ингибирование проводили следующим образом: капли по 25 нл каждого тестируемого соединения (максимальная концентрация 10 мМ с сериями 11-точечных 3-кратных разведений для каждого соединения), солюбилизированные в DMSO, переносили в лунки белого 1536-луночного планшета (Corning 3725). Готовили 5 мл раствора фермент/липидного субстрата с 2-кратной конечной концентрацией реакционной смеси путем объединения 2,5 мл 4-кратного раствора фермента (20 нМ DGK α или DGK ζ (приготовленного, как описано ниже) в аналитическом буфере) и 2,5 мл 4-кратного липосомального или 4-кратного детергент/липидного мицеллярного раствора (составы описаны ниже), и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в лунки, содержащие тестируемое соединение, добавляли 1 мкл 2-кратного раствора фермент/липидного субстрата, и реакции инициировали добавлением 1 мкл 300 мкМ АТФ. Реакциям давали возможность протекать в течение 2 ч, после чего добавляли 2 мкл реагента Glo Reagent (Promega V9101) и инкубировали в течение 40 минут. Затем добавляли 4 мкл реагента Kinase Detection Reagent и инкубировали в течение 30 минут. Люминесценцию регистрировали с помощью микропланшетного ридера EnVision. Процентное ингибирование рассчитывали по конверсии АТФ, генерируемой в реакциях без ферментативного контроля для 100% ингибирования и в реакциях только с носителем для 0% ингибирования. Соединения оценивали при 11 концентрациях для определения IC₅₀.

4x Детергент/липидный мицеллярный препарат

Детергент/липидную мицеллу получали путем объединения 15 г фосфатидилсерина (Avanti 840035P) и 1 г диацилглицерина (800811O) и растворения в 150 мл хлороформа в 2 л круглодонной колбе. Хлороформ удаляли под высоким

вакуумом на роторном испарителе. Полученное бесцветное липкое масло ресуспендировали в 400 мл 50 мМ MOPS pH 7,5, 100 мМ NaCl, 20 мМ NaF, 10 мМ MgCl₂, 1 мкМ CaCl₂, 1 мМ DTT и 200 мМ октилглюкозида путем интенсивного перемешивания. Раствор липид/детергент разделяли на аликвоты по 5 мл и хранили при -80°C.

2x Липосомный препарат

Липидный состав представлял собой 5 мол.% DAG (Avanti 800811O), 40 мол.% PS (Avanti 840035P) и 55 мол.% PC (Avanti 850457) при общей концентрации липидов 7-8 мг/мл для раствора липосом. PC, DAG и PS растворяли в хлороформе, объединяли и сушили в вакууме до образования тонкой пленки. Липиды гидратировали до 20 мМ в 50 мМ MOPS, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, и пять раз замораживали-оттаивали. Суспензию липидов экструдировали через 100-нм поликарбонатный фильтр 10-12 раз. Для подтверждения размера липосом (радиус 50-60 нм) проводили динамическое светорассеяние. Липосомный препарат хранили при 4°C в течение четырех недель.

Бакуловиральная экспрессия DGK α человека почти полной длины и DGK ζ человека полной длины

Образцы бакуловируса человека MA-hDGK α -(S9-S727)-Ct-TVMV-His-pFBgate и DGK ζ -transcript variant-2-TVMV-His-pFBgate полной длины были созданы с использованием системы экспрессии бакуловируса Bac-to-Bac (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя (примечание: MA в названии реагентов DGK α обозначает две дополнительные аминокислоты, добавленные перед Ser-9). ДНК, используемая для экспрессии DGK-альфа(9-727) и DGK-дзета, имеет последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Амплификацию бакуловируса проводили с использованием инфицированных клеток Sf9 при соотношении вирус/клетка 1:1500 и выращивали в течение 65 часов при 27°C после трансфекции.

Увеличение экспрессии для белка DGK- α (9-727) почти полной длины проводили в 2 л колбах, и для полноразмерного DGK-дзета с использованием системы Cellbag 50L WAVE-Bioreactor System 20/50 от GE Healthcare Bioscience. Белки экспрессировали в разных объемах в сходных условиях. Для экспрессии DGK α (9-727) использовали 2 флакона по 2 л, каждый из которых содержал 0,8 л конечного объема культуральной среды, и DGK ζ выращивали в масштабе 12 л в Cellbag на 50 л. Для каждого исходную

плотность 2×10^6 клеток/мл клеток Sf9 (Expression System, Davis, CA) высевали в среду для насекомых ESF921 (Expression System), инфицировали исходным вирусом при соотношении вирус/клетка 1:200 и выращивали в течение 66-68 часов при 27°C после заражения. Зараженные культуры клеток собирали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в центрифуге SORVALL® RC12BP. Осадки клеток хранили при -80°C до очистки.

Очистка DGK-альфа и DGK-дзета человека

Каждую экспрессированную человеческую DGK α (9-727) и полноразмерную DGK ζ , содержащую TVMV-расщепляемую С-концевую последовательность гекса-His-метки (SEQ ID NO: 2 и 4, соответственно), и полученную, как описано выше, очищали из суспензии клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Клеточные суспензии оттаивали и суспендировали в буфере (50 mM HEPES, pH 7,2, 300 mM NaCl, 10% об./об. глицерина, 1 mM ТСЕР, содержащий ингибиторы бензоазы и протеазы) до 1:10 об./об. исходного объема культуры. Лизис осуществляли с использованием метода кавитации азотом в Азотной бомбе (Part Instruments) и лизаты осветляли центрифугированием с высокой скоростью. Осветленные лизаты очищали до ~90% гомогенности с использованием трех последовательных стадий колоночной хроматографии, соответственно, в системе ÄKTA Purifier Plus. Обе изоформы очищали никель-аффинной очисткой с элюированием в градиенте имидазола (например, HisTrap FF, GE Healthcare) с последующей эксклюзионной хроматографией (например, HiLoad 26/600 Superdex 200 prepgrade, GE Healthcare, для DGK α (9-727) и HiPrep 26/600 Sephacryl S 300 HR, GE Healthcare, для DGK ζ). Эти две стадии обеспечили DGK α (9-727) с чистотой >90%. Для достижения аналогичной чистоты для DGK ζ полной длины потребовалась третья стадия с применением катионообменной хроматографии (SP Sepharose FF, GE Healthcare) и элюирования градиентом NaCl. Конечные буферы для составления были одинаковыми для обоих белков: DGK α (9-727), приготовленный в 50 mM HEPES, pH 7,3, 300 mM NaCl, 10% об./об. глицерина и 1 mM ТСЕР, и DGK ζ полной длины, приготовленный в 50 mM HEPES, pH 7,3, 500 mM NaCl, 5% об./об. глицерина и 1 mM ТСЕР. Белки концентрировали до концентрации 1-2 мг/мл, мгновенно замораживали и содержали при температуре -80°C для длительного хранения.

Анализ 3: Анализ IL2 с использованием CD4 Т-клеток и клеток Raji

1536-Луночный анализ IL-2 проводили в объеме 4 мкл с использованием предварительно активированных CD4 Т-клеток и клеток Raji. Перед анализом CD4 Т-клетки предварительно активировали путем обработки α -CD3, α -CD28 и РНА при 1,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно. Клетки Raji обрабатывали стафилококковым энтеротоксином В (SEB) при 10000 нг/мл. Серийно разведенные соединения сначала переносили в 1536-луночный аналитический планшет (Corning, #3727), затем добавляли 2 мкл предварительно активированных CD4 Т-клеток (конечная плотность 6000 клеток/лунку) и 2 мкл SEB-обработанных клеток Raji (2000 клеток/лунку). После 24 часов инкубации в инкубаторе при 37°C/в атмосфере 5% CO₂ в аналитический планшет добавляли 4 мкл реагентов для обнаружения IL-2 (Cisbio, #64IL2PEC). Аналитические планшеты считывали на ридере Envision. Для оценки цитотоксичности соединений CD4 Т-клетки или клетки Raji инкубировали с серийно разведенными соединениями. После инкубации в течение 24 часов добавляли 4 мкл Cell Titer Glo (Promega, #G7572) и планшеты считывали на ридере Envision. 50% эффективную концентрацию (IC₅₀) рассчитывали с использованием четырехпараметрической логистической формулы: $y = A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$, где А и В обозначают минимальный и максимальный % активации или ингибирования, соответственно, С представляет собой IC₅₀, D представляет собой наклон кривой, и х представляет концентрацию соединения.

Анализ 4: Анализ пролиферации CD8 Т-клеток с использованием CellTiter-Glo

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека оттаивали в RPMI + 10% FBS, инкубировали в течение 2 ч при 37°C и подсчитывали. 384-Луночный планшет для тканевых культур покрывали в течение ночи при 4°C 20 мкл анти-человеческого CD3 при 0,1 мкг/мл в чистой среде RPMI, которую удаляли с планшета перед добавлением 20 тыс./40 мкл CD8 Т-клеток с 0,5 мкг/мл растворимого анти-человеческого CD28. Соединения переносили на клеточный планшет сразу после посева клеток. После инкубации в течение 72 ч при 37°C в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента CellTiter-glo (номер по каталогу Promega G7570). Планшет интенсивно встряхивали в течение 5 мин, инкубировали при комнатной температуре еще 15 минут и считывали на Envision пролиферацию CD8 Т-клеток. В анализе стимулированный 0,1 мкг/мл анти-CD3 и 0,5 мкг/мл анти-CD28 сигнал CD8 Т-клеток был фоном. Эталонное соединение, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрил, при 3 мкМ использовали для установки 100%

диапазона, и EC_{50} использовали при абсолютном значении 50% для нормализации данных.

Анализ 5: AP1-репортерный анализ DGK

Репортер AP1-люциферазы в клетках Jurkat создавали с использованием набора Signal Lenti AP1 Reporter (luc) от SABiosciences (CLS-011L).

Соединения переносили из планшета Echo LDV в отдельные лунки 384-луночного планшета (белый, с твердым дном, непрозрачный PE CulturPlate 6007768) с использованием прибора Echo550. Размер пробы составлял 30 нл на лунку; и один целевой планшет на исходный планшет. Клеточные суспензии готовили путем переноса 40 мл клеток (2 раза по 20 мл) в чистые конические пробирки на 50 мл. Клетки концентрировали центрифугированием (1200 об/мин, 5 мин, комнатная температура). Супернатант удаляли, и все клетки суспендировали в RPMI (Gibco 11875) + 10% FBS до получения концентрации $1,35 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки добавляли вручную с помощью многоканальной пипетки, 30 мкл/лунку клеточной суспензии, в 384-луночный планшет TC, содержащий соединения, $4,0 \times 10^4$ клеток на лунку. Планшеты с клетками инкубировали в течение 20 минут при 37°C и в атмосфере 5% CO₂.

Во время инкубации готовили растворы антител к CD3 (α CD3) путем смешивания 3 мкл α CD3 (1,3 мг/мл) с 10 мл среды [конечная концентрация = 0,4 мкг/мл]. Затем 1,5 мкл α CD3 (1,3 мг/мл) смешивали с 0,5 мл среды [конечная концентрация = 4 мкг/мл]. Через 20 минут 10 мкл среды добавляли во все лунки в колонке 1, лунки от A до M, и 10 мкл α CD3 (4 мкг/мл) на лунку добавляли в колонку 1, ряды с N по P для сравнения. Затем с помощью многоканальной пипетки добавляли 10 мкл α CD3 (0,4 мкг/мл) на лунку. Стимулированные α CD3, +/- обработанные соединением клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов.

В течение этого периода инкубации реагент Steady-Glo (Promega E2520) медленно оттаивали до температуры окружающей среды. Затем добавляли по 20 мкл реагента Steady-Glo на лунку с помощью многокапельного Combi-дозатора. Пузырьки удаляли центрифугированием (2000 об/мин, температура окружающей среды, 10 сек). Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Образцы характеризовали путем измерения относительных световых единиц (RLU) с использованием прибора для считывания планшетов Envision по протоколу люминесценции. Данные анализировали с использованием эталонного соединения, 8-

(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, для нормализации к 100% ингибирования.

Анализ 6: Анализ мышинных цитотоксических Т-лимфоцитов

Был разработан анализ антигенспецифических цитолитических Т-клеток (CTL) для функциональной оценки способности ингибиторов DGK α и DGK ζ усиливать опосредованную эффекторными Т-клетками активность в отношении уничтожения опухолевых клеток. CD8⁺ Т-клетки, выделенные из трансгенной мыши OT-1, распознают антигенпрезентирующие клетки, MC38, которые презентуют пептид SIINFEKL из овальбумина. Распознавание когнатного антигена инициирует цитолитическую активность OT-1 антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Функциональные клетки CTL получали следующим образом: OT-1 спленоциты от мышей в возрасте 8-12 недель выделяли и размножали в присутствии пептида SIINFEKL при 1 мкг/мл и mIL2 при 10 Ед/мл. Через три дня добавляли свежую среду с mIL2 Ед/мл. На 5-й день размножения CD8⁺ Т-клетки были выделены и готовы к использованию. Активированные клетки CTL можно хранить в замороженном виде в течение 6 месяцев. Отдельно один миллион опухолевых клеток MC38 обрабатывали 1 мкг/мл пептида SIINFEKL-OVA в течение 3 часов при 37°C. Клетки промывали (3X) свежей средой для удаления избытка пептида. Наконец, клетки CTL, которые были предварительно обработаны ингибиторами DGK в течение 1 часа в 96-луночном планшете с U-образным дном, объединяли с нагруженными антигеном опухолевыми клетками MC38 в соотношении 1:10. Затем клетки вращали при 700 об/мин в течение 5 мин и помещали в инкубатор на ночь при 37°C. Через 24 часа супернатант собирали для анализа уровней цитокинов IFN- γ с помощью AlphaLisa, приобретенного у Perkin Elmer.

Анализ 7: Анализ пролиферации РНА

Стимулированные фитогемагглютинином (PHA) бластные клетки из замороженных запасов инкубировали в среде RPMI (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) в течение одного часа перед добавлением в отдельные лунки 384-луночного планшета (10000 клеток на лунку). Соединения переносили в отдельные лунки 384-луночного планшета, и обработанные клетки выдерживали при 37°C, атмосфере 5%

CO₂ в течение 72 ч в культуральной среде, содержащей человеческий IL2 (20 нг/мл), перед измерением роста с использованием реагента MTS [3-(4,5-диметил-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий], следуя инструкциям производителя (Promega, Madison, WI). Процентное ингибирование рассчитывали, сравнивая значения между стимулированным IL2 (0% ингибирование) и нестимулированным контролем (100% ингибирование). Значения ингибирующей концентрации (IC₅₀) рассчитывали на основе 50% ингибирования по кратности индукции между стимулированными IL2 и нестимулированными обработками.

Анализ 8: Анализ IFN- γ с использованием CD8 Т-клеток человека

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 ч при 37°C и подсчитывали. 384-Луночный планшет для тканевых культур покрывали в течение ночи при 4°C 20 мкл анти-CD3 человека при 0,05 мкг/мл в PBS, который удаляли с планшета перед внесением в каждую лунку 40000 клеток на 40 микролитров CD8 Т-клеток с 0,1 мкг/мл растворимого анти-человеческого CD28. Соединения переносили с использованием жидкостного манипулятора Echo на планшет после посева клеток. После 20 ч инкубации в инкубаторе при 37°C супернатанты по 3 микролитра на лунку переносили в новый 384-луночный белый аналитический планшет для анализа цитокинов.

Количество интерферона- γ (IFN- γ) определяли с использованием набора AlphLISA (Cat#AL217), как описано в руководстве производителя (Perkin Elmer). Подсчеты в каждой лунке переводили в концентрацию IFN- γ (пг/мл). Значения EC₅₀ соединения определяли путем установки 0,05 мкг/мл анти-CD3 плюс 0,1 мкг/мл анти-CD28 в качестве исходного уровня и совместной стимуляции 3 мкМ эталонного соединения, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, с анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве 100% активации.

Анализ 9: Анализ pERK с использованием CD8 Т-клеток человека

Замороженные наивные CD8 Т-клетки человека оттаивали в среде AIM-V, инкубировали в течение 2 ч при 37°C и подсчитывали. CD8-Позитивные Т-клетки вносили в 384-луночный планшет для культивирования тканей по 20000 клеток на лунку в среде AIM-V. В каждую лунку добавляли по одному соединению, затем добавляли связанные с шариками моноклональные антитела против CD3 человека и

против CD28 человека в конечной концентрации 0,3 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением лизирующего буфера из набора AlphaLISA Surefire kit. (Perkin Elmer, cat# ALSU-PERK-A). Лизат (5 мкл на лунку) переносили в новый 384-луночный белый аналитический планшет для измерения активации pERK.

Значения EC₅₀ соединений определяли, устанавливая анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве исходного уровня, и совместное стимулирование 3 мкМ 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила с анти-CD3 плюс анти-CD28 как 100% активации.

Анализ 10: Анализ IFN- γ с использованием цельной крови человека

Цельную венозную кровь человека (22,5 мкл на лунку), полученную от здоровых доноров, предварительно обрабатывали соединениями в течение одного часа при 37°C в инкубаторе в атмосфере 95% увлажненного воздуха/5% CO₂. Кровь стимулировали с помощью 2,5 мкл mAb против человеческого CD3 и против CD28 в конечной концентрации 1 мкг/мл каждого в течение 24 часов при 37°C. IFN- γ в супернатантах измеряли с использованием набора AlphaLISA (Cat#AL217).

Значения EC₅₀ соединений определяли, устанавливая анти-CD3 плюс анти-CD28 в качестве исходного уровня, и костимуляцию 3 мкМ эталонного соединения, 8-(4-(бис(4-фторфенил)метил)пиперазин-1-ил)-5-метил-7-нитро-6-оксо-5,6-дигидро-1,5-нафтиридин-2-карбонитрила, с анти-CD3 плюс анти-CD28 как 100% активации.

Анализ 11: DGK Анализ pERK с использованием цельной крови человека

Анализ фосфорилирования ERK цельной крови человека проводили с использованием цельной венозной крови человека, полученной от здоровых доноров (отобранной с гепарином в качестве антикоагулянта). Серийные разведения соединений (11 точек, 3-кратные) в DMSO добавляли в 384-луночные планшеты по 20 нл/лунку с использованием акустического дозатора ECHO 550 (Labcyte) до достижения конечной начальной концентрации 20 мкМ в анализе. Гепаринизированную цельную кровь человека добавляли в планшет с соединением по 9 мкл на лунку и инкубировали в течение одного часа при 37°C в инкубаторе в атмосфере 95% увлажненного воздуха/5% CO₂. После одного часа инкубации соединений в лунку добавляли 1 мкл человеческого анти-CD3-антитела (внутреннего производства) в присутствии сшивающего антитела козьего анти-мышинного IgG (4 мкг/мл) в конечной

концентрации 1 мкг/мл для стимуляции пути и дополнительно инкубировали в течение 15 минут при 37°C. Стимуляцию останавливали добавлением 90 мкл буфера Fix/Lyse (BD 558049). Клетки промывали и окрашивали антителами против CD8 PE (BD 555635) в течение 60 минут при комнатной температуре, снова промывали и подвергали пермеабиллизации на льду с использованием буфера Perm III (BD 558050) в течение 30 минут. Затем клетки окрашивали Alexa Fluor® 647 анти-ERK1/2 Phospho (Thr202/Tyr204) антителом (Bioleged 675504) в течение 60 минут в разведении 1:50. Образцы промывали и ресуспендировали в dPBS, содержащем 1% BSA (dPBS, Gibco 14190136; BSA, Sigma-Aldrich A9205). Образцы анализировали с помощью Intellicyt® iQue Screener PLUS. Активацию pERK количественно оценивали по проценту pERK-положительной популяции среди CD8-положительной популяции. Расчеты активности соединения были основаны на внутреннем соединении при концентрации 20 мкМ как 100% активации и анти-CD3-контроле как 0% активации.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hDGK α -(M1-S735)-Ct-TVMV-

His:

```

1   ATGGCCAAGG AGAGGGGCCT AATAAGCCCC AGTGATTTTG CCCAGCTGCA
51  AAAATACATG GAATACTCCA CCAAAAAGGT CAGTGATGTC СТАААГСТСТ
101 TCGAGGATGG CGAGATGGCT AAATATGTCC AAGGAGATGC CATTTGGGTAC
151 GAGGGATTCC AGCAATTCCT GAAAATCTAT CTCGAAGTGG АТААТГТТСС
201 CAGACACСТА AGCCTGGCAC TGTTCААТC СТТТGAGACT GGTCACTGCT
251 TAAATGAGAC AAATGTGACA AAAGATGTGG TGTGTCTCAA TGATGTTTCC
301 TGCTACTTTT CCCTTCTGGA GGGTGGTCGG CCAGAAGACA AGTTAGAAAT
351 SACSTTCAAG CTGTACGACA CGGACAGAAA TGGGATCCTG GACAGCTCAG
401 AAGTGGACAA AATTATCCTA CAGATGATGC GAGTGGCTGA ATACCTGGAT
451 TGGGATGTGT CTGAGCTGAG GCCGATTCTT CAGGAGATGA TGAAAGAGAT
501 TGACTATGAT GGCAGTGGCT CTGTCTCTCA AGCTGAGTGG GTCCGGGCTG
551 GGGCCACCAC CGTGCCACTG СТАГТГСТГC TGGGTCTGGA GATGACTCTG
601 AAGGACGACG GACAGCACAT GTGGAGGCC AAGAGGTTCC CCAGACCAGT
651 СТАCTGCAAT CTGTGCGAGT CAAGCATTGG TCTTGCCAAA CAGGGACTGA
701 GCTGTAACCT CTGTAAGTAC ACTGTTACG ACCAGTGTGC CATGAAAGCC
751 CTGCSTTGTG AAGTCAGCAC СТАTGCCAAG TCTCGGAAG ACATTGGTGT
801 CCAATCACAT GTGTGGGTGC GAGGAGGCTG TGAGTCCGGG CGCTGCGACC
851 GCTGTCAGAA AAAGATCCGG ATCTACCACA GTCTGACCGG GCTGCATTGT
901 GTATGGTGCC ACCTAGAGAT CCACGATGAC TGCCTGCAAG CGGTGGGCCA
951 TGAGTGTGAC TGTGGGCTGC TCCGGGATCA CATCTGCCT CCATCTTCCA
1001 TCTATCCCAG TGTCSTGGCC TCTGGACCGG ATCGTAAAAA TAGCAAAAACA
1051 AGCCAGAAGA CCATGGATGA TTAAATTTG AGCACCTCTG AGGCTCTGCG
1101 GATTGACCCT GTTCCTAACA CCCACCCACT TCTCGTCTTT GTCAATCCTA
1151 AGAGTGGCGG GAAGCAGGGG CAGAGGGTGC TCTGGAAGTT CCAGTATATA
1201 TTAACCCTC GACAGGTGTT CAACCTCCTA AAGGATGGTC CTGAGATAGG
1251 GCTCCGATTA TTCAAGGATG TTCCTGATAG CCGGATTTTG GTGTGTGGTG
1301 GAGACGGCAC AGTAGGCTGG ATTCTAGAGA CCATTGACAA AGСТААСТТG
1351 CCAGTTTTGC CTCCTGTTGC TGTGTTGCC CTGGGTACTG GAAATGATCT
1401 GGCTCGATGC СТАAGATGGG GAGGAGGTTA TGAAGGACAG AATCTGGCAA
1451 AGATCCTCAA GGATTTAGAG ATGAGTAAAG TGGTACATAT GGATCGATGG
1501 TCTGTGGAGG TGATACCTCA ACAAAC TGAA GAAAAAAGTG ACCCAGTCCC
1551 СТТТCAAATC ATCAATAACT ACTTCTCTAT TGGCGTGGAT GCCTCTATTG
1601 CTCATCGATT CCACATCATG CGAGAGAAAT ATCCGGAGAA GTTCAACAGC
1651 AGAATGAAGA ACAAGCTATG GТАCTTCGAA TTTGCCACAT CTGAATCCAT

```

1701 CTTCTCAACA TGCAAAAAGC TGGAGGAGTC TTTGACAGTT GAGATCTGTG
 1751 GGAAACCGCT GGATCTGAGC AACCTGTCCC TAGAAGGCAT CGCAGTGCTA
 1801 AACATCCCTA GCATGCATGG TGGCTCCAAC CTCTGGGGTG ATACCAGGAG
 1851 ACCCCATGGG GATATCTATG GGATCAACCA GGCCTTAGGT GCTACAGCTA
 1901 AAGTCATCAC CGACCCTGAT ATCCTGAAAA CCTGTGTACC AGACCTAAGT
 1951 GACAAGAGAC TGGAAGTGGT TGGGCTGGAG GGTGCAATTG AGATGGGCCA
 2001 AATCTATAAC AAGCTCAAGA ATGCTGGACG TCGGCTGGCC AAGTGTCTTG
 2051 AGATCACCTT CCACACCACA AAAACCCCTC CCATGCAAAAT TGACGGAGAA
 2101 CCCTGGATGC AGACGCCCTG TACAATCAAG ATCACCCACA AGAACCAGAT
 2151 GCCCATGCTC ATGGGCCCCAC CCCCCGCTC CACCAATTTT TTTGGCTTCT
 2201 TGAGCGGATC CTCGGAGACA GTGCGGTTTC AGGGACACCA CCACCATCAC
 2251 CACTGA

(SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность hDGK α -(M1-S735)-Ct-TVMV-His:

0001 MAKERGLISP SFAQLQKYM EYSTKKVSDV LKLFEDGEMA KYVQGDALIGY EGFQQFLKIY 0060
 0061 LEVDNVPRHL SLALFQSFET GHCLNETNVT KDVVCLNDVS CYFSLLEGGR PEDKLEFTFK 0120
 0121 LYDTRNGIL DSSEVDKIIL QMMRVAEYLD WDVSELRPIL QEMMKEIDYD GSGSVSQAEW 0180
 0181 VRAGATTVPL LVLLGLEMTL KDDGQHMWRP KRFRPVYCN LCESSIGLGK QGLSCNLCKY 0240
 0241 TVHDQCAMKA LPCEVSTYAK SRKDIGVQSH VWVRGGCESG RCDRCQKKIR IYHSLTGLHC 0300
 0301 VWCHLEIHDD CLQAVGHECD CGLLRDHILP PSSIYPSVLA SGPDRKNSKT SQKTMDDLNL 0360
 0361 STSEALRIDP VPNTHPLLVF VNPKSGGKQG QRVLWKFQYI LNPRQVFNLL KDGPEIGLRL 0420
 0421 FKDVPSRIL VCGGDGTVGW ILETIDKANL PVLPPVAVLP LGTGNDLARC LRWGGGYEGQ 0480
 0481 NLAKILKDL MSKVHMDRW SVEVIPQOTE EKSDPVVFI INNYFSIGVD ASIAHRFHIM 0540
 0541 REKYPEKFNS RMKNKLWYFE FATSESIFST CKKLEESLTV EICGKPLDLS NLSLEGI AVL 0600
 0601 NIPSMHGGSN LWGDTRRPHG DIYGINQALG ATAKVITDPD ILKTCVPDLS DKRLEVVGLE 0660
 0661 GAIEMGQIYT KLKNAGRRLA KCSEITFHNT KTLPMQIDGE PWMQTPCTIK ITHKNQMPML 0720
 0721 MGPPRSTNF FGFLSGSSET VRFQGHNNHH H 0751

(SEQ ID NO: 2)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hDGK ζ -(M1-A928)-transcript variant-2

Ct-TVMV-His:

1 ATGGAGCCGC GGGACGGTAG CCCCAGGCC CGGAGCAGCG ACTCCGAGTC
 51 GGCTTCCGCC TCGTCCAGCG GCTCCGAGCG CGACGCCGGT CCCGAGCCGG
 101 ACAAGGCGCC GCGGCGACTC AACAAAGCGC GCTTCCCAGG GCTGCGGCTC
 151 TTCGGGCACA GGAAAGCCAT CACGAAGTCG GGCCTCCAGC ACCTGGCCCC
 201 CCCTCCGCCC ACCCCTGGGG CCCCCTGCAG CGAGTCAGAG CGGCAGATCC
 251 GGAGTACAGT GGAAGTGGAG GAGTCAGCGA CATATGGGGA GCACATCTGG
 301 TTCGAGACCA ACGTGTCCGG GGAAGTCTGC TACGTTGGGG AGCAGTACTG
 351 TGTAGCCAGG ATGCTGCAGA AGTCAGTGTC TCGAAGAAAG TGCGCAGCCT
 401 GCAAGATTGT GGTGCACACG CCCTGCATCG AGCAGCTGGA GAAGATAAAT
 451 TTCGCTGTA AGCCGTCCTT CCGTGAATCA GGCTCCAGGA ATGTCCGCGA
 501 GCCAACCTTT GTACGGCACC ACTGGGTACA CAGACGACGC CAGGACGGCA
 551 AGTGTCCGCA CTGTGGGAAG GGATTCCAGC AGAAGTTCAC CTTCACAGC
 601 AAGGAGATTG TGGCCATCAG CTGCTCGTGG TGCAAGCAGG CATAACACAG
 651 CAAGGTGTCC TGCTTCATGC TGCAGCAGAT CGAGGAGCCG TGCTCGCTGG
 701 GGGTCCACGC AGCCGTGGTC ATCCCAGCCA CCTGGATCCT CCGCGCCCCG
 751 AGGCCCCAGA ATACTCTGAA AGCAAGCAAG AAGAAGAAGA GGGCATCCTT
 801 CAAGAGGAAG TCCAGCAAGA AAGGGCCTGA GGAGGGCCGC TGGAGACCCT
 851 TCATCATCAG GCCACCCCC TCCCCGCTCA TGAAGCCCT GCTGGTGTCT
 901 GTGAACCCCA AGAGTGGGG CAACCAGGGT GCAAAGATCA TCCAGTCTTT

951 CCTCTGGTAT CTCAATCCCC GACAAGTCTT CGACCTGAGC CAGGGAGGGC
1001 CCAAGGAGGC GCTGGAGATG TACCGCAAAG TGCACAACCT GCGGATCCTG
1051 GCGTGCGGGG GCGACGGCAC GGTGGGCTGG ATCCTCTCCA CCCTGGACCA
1101 GCTACGCCTG AAGCCGCCAC CCCCTGTTGC CATCCTGCCC CTGGGTACTG
1151 GCAACGACTT GGCCCGAACC CTCAACTGGG GTGGGGGCTA CACAGATGAG
1201 CCTGTGTCCA AGATCCTCTC CCACGTGGAG GAGGGGAACG TGGTACAGCT
1251 GGACCGCTGG GACCTCCACG CTGAGCCCAA CCCCAGGGCA GGGCCTGAGG
1301 ACCGAGATGA AGGCGCCACC GACCGGTTGC CCCTGGATGT CTCAACAAC
1351 TACTTCAGCC TGGGCTTTGA CGCCACGTC ACCCTGGAGT TCCACGAGTC
1401 TCGAGAGGCC AACCCAGAGA AATCAACAG CCGCTTTCGG AATAAGATGT
1451 TCTACGCCGG GACAGCTTTC TCTGACTTCC TGATGGGCAG CTCCAAGGAC
1501 CTGGCCAAGC ACATCCGAGT GGTGTGTGAT GGAATGGACT TGACTCCCAA
1551 GATCCAGGAC CTGAAACCCC AGTGTGTTGT TTTCTGAAC ATCCCCAGGT
1601 ACTGTGCGGG CACCATGCCC TGGGGCCACC CTGGGGAGCA CCACGACTTT
1651 GAGCCCCAGC GGCATGACGA CGGCTACCTC GAGGTCATTG GCTTCACCAT
1701 GACGTCGTTG GCCGCGCTGC AGGTGGGCGG ACACGGCGAG CGGCTGACGC
1751 AGTGTGCGGA GGTGGTGCTC ACCACATCCA AGGCCATCCC GGTGCAGGTG
1801 GATGGCGAGC CCTGCAAGCT TGCAGCCTCA CGCATCCGA TCGCCTGCG
1851 CAACCAGGCC ACCATGGTGC AGAAGGCCAA GCGGCGGAGC GCCGCCCC
1901 TGCACAGCGA CCAGCAGCCG GTGCCAGAGC AGTTGCGCAT CCAGGTGAGT
1951 CGCGTCAGCA TGCACGACTA TGAGGCCCTG CACTACGACA AGGAGCAGCT
2001 CAAGGAGGCC TCTGTGCCGC TGGGCACTGT GGTGGTCCCA GGAGACAGTG
2051 ACCTAGAGCT CTGCCGTGCC CACATTGAGA GACTCCAGCA GGAGCCCGAT
2101 GGTGCTGGAG CCAAGTCCCC GACATGCCAG AAAGTGTCCC CCAAGTGGTG
2151 CTTCTGGAC GCCACCACTG CCAGCCGCTT CTACAGGATC GACCGAGCCC
2201 AGGAGACCTT CAACTATGTG ACTGAGATCG CACAGGATGA GATTTATATC
2251 CTGGACCCTG AGTGCTGGG GGCATCGGCC CGGCCTGACC TCCCAACCCC
2301 CACTTCCCCT CTCCCCACCT CACCCTGCTC ACCCACGCCC CGGTCACTGC
2351 AAGGGGATGC TGCACCCCT CAAGGTGAAG AGCTGATTGA GGCTGCCAAG
2401 AGGAACGACT TCTGTAAGCT CCAGGAGCTG CACCGAGCTG GGGGCGACCT
2451 CATGCACCGA GACGAGCAGA GTCGCACGCT CCTGCACCAC GCAGTCAGCA
2501 CTGGCAGCAA GGATGTGGTC CGCTACCTGC TGGACCACGC CCCCCAGAG
2551 ATCCTTGATG CGGTGGAGGA AAACGGGGAG ACCTGTTTGC ACCAAGCAGC
2601 GGCCCTGGGC CAGCGCACCA TCTGCCACTA CATCGTGGAG GCCGGGGCCT
2651 CGCTCATGAA GACAGACCAG CAGGGCGACA CTCCCCGGA GCGGGCTGAG
2701 AAGGCTCAGG ACACCGAGCT GGCCGCCTAC CTGGAGAACC GGCAGCACTA
2751 CCAGATGATC CAGCGGGAGG ACCAGGAGAC GGCTGTGGGA TCCTCGGAGA
2801 CAGTGCGGTT TCAGGGACAC CACCACCATC ACCACTGA

(SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность hDGK ζ -(M1-A928)-transcript variant-2 Ct-TVMV-

His:

0001 MEPRDGSPEA RSSDSESASA SSSGSERDAG PEPDKAPRRL NKRRFPGLRL FGHRKAITKS 0060
0061 GLQHLAPPPP TPGAPCSESE RQIRSTVDWS ESATYGEHIW FETNVSGDFC YVGEQYCVAR 0120
0121 mLQKSVSRK CAACKIVVHT PCIEQLEKIN FRCKPSFRES GSRNVREPTF VRHHVHRRR 0180
0181 QDGKCRHCGK GFQQKFTFHS KEIVAIKSW CKQAYHSKVS CFMLQQIEEP CSLGVHAAV 0240
0241 IPPTWILRAR RPQNTLKASK KKKRASFKRK SSKKGPEEGR WRPFIIIRPTP SPLMKPLLVF 0300
0301 VNPKSGGNQG AKIIQSFLWY LNPRQVFDLS QGGPKALEM YRKVHNLRL ACGGDGTVGW 0360
0361 ILSTLDQLRL KPPPPVAILP LGTGNDLART LNWGGGYTDE PVSKILSHVE EGNVQLDRW 0420
0421 DLHAEPNPEA GPEDRDEGAT DRLPLDVFN YFSLGFDAHV TLEFHESREA NPEKFNSRFR 0480
0481 NKMFYAGTAF SDFLMGSSKD LAKHIRVVD GMDLTPKIQD LKPQCVVFLN IPRYAGTMP 0540
0541 WGHPGEHDF EPQRHDDGYL EVIGFTMTSL AALQVGGHGE RLTQCREVVL TSKAIPVQV 0600
0601 DGEFCKLAAS RIRIALRNQA TMVQKAKRRS AAPLHSDQQP VPEQLRIQVS RVSMHDYEAL 0660
0661 HYDKEQLKEA SVPLGTVVVP GDSDEL CRA HIERLQQEPD GAGAKSPTCQ KLSPKWCFLD 0720

0721 ATTASRFYRI DRAQEHLNYV TEIAQDEIYI LDPELLGASA RPDLPPTSP LPTSPCSPTP 0780
 0781 RSLQGDAAPP QGEELIEAAK RNDFKLQEL HRAGGDLMHR DEQSRTLLHH AVSTGSKDVV 0840
 0841 RYLLDHAPPE ILDAVEENGE TCLHQAAALG QRTICHYIVE AGASLMKTDQ QGDTPRQRAE 0900
 0901 KAQDTELAAY LENRQHYQMI QREDQETAVG SSETVRFQGH HHHHH 0945

(SEQ ID NO: 4)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая MA-hDGK α -(S9-S727)-Ct-TVMV-His:

0001 ATGGCTTCCC CAAGCGACTT CGCCAGCTG CAGAAGTACA TGAATACAG CACCAAGAAG 0060
 0061 GTGTCTGACG TCCTGAAGCT GTTCGAGGAC GGTGAAATGG CTAAGTACGT CCAGGGCGAC 0120
 0121 GCTATCGGAT ACGAGGGATT CCAGCAGTTC CTGAAGATCT ACCTGGAAGT GGACAACGTC 0180
 0181 CCCAGGCACC TGTCACTGGC TCTGTTCCAG TCCTTCGAGA CTGGCCACTG CCTGAACGAA 0240
 0241 ACCAACGTCA CTAAGGACGT GGTCTGCCTG AACGACGTGA GCTGCTACTT CTCTCTGCTG 0300
 0301 GAGGGTGGCA GACCAGAGGA CAAGCTGGAA TTCACCTTCA AGCTGTACGA CACTGACCGC 0360
 0361 AACGGAATCC TGGACTCCAG CGAAGTGGAC AAGATCATCC TGCAGATGAT GCGTGTGCT 0420
 0421 GAGTACCTGG ACTGGGACGT GAGCGAACTG AGGCCTATCC TGCAGGAGAT GATGAAGGAA 0480
 0481 ATCGACTACG ACGGCTCTGG ATCAGTGTCC CAGGCTGAGT GGGTCCGCGC TGGTGTAC 0540
 0541 ACTGTGCCAC TGCTGGTCCT GCTGGGACTG GAAATGACCC TGAAGGACGA CGGTCAGCAC 0600
 0601 ATGTGGCGCC CAAAGCGTTF CCCCAGGCCA GTCTACTGCA ACCTGTGCGA GTCTTCAATC 0660
 0661 GGTCTGGGCA AGCAGGGCCT GTCATGCAAC CTGTGCAAGT ACACCGTGCA CGACCAGTGC 0720
 0721 GCTATGAAGG CCCTGCCCTG CGAGGTCTCA ACTTACGCTA AGTCCCCTAA GGACATCGGA 0780
 0781 GTGCAGTCAC ACGTGTGGGT CAGGGGAGGT TGCGAATCCG GTAGATGCGA CCGCTGCCAG 0840
 0841 AAGAAGATCC GTATCTACCA CTCCTGACC GGAATGCACT GCGTCTGGTG CCACCTGGAG 0900
 0901 ATCCACGACG ACTGCCTGCA GGCCGTGGGA CACGAATGCG ACTGCGGTCT GCTGCGTGAC 0960
 0961 CACATCCTGC CTCCTCCAG CATCTACCCT TCAGTCTGG CTTCGGTCC CGACAGGAAG 1020
 1021 AACAGCAAGA CCTCTCAGAA GACTATGGAC GACCTGAACC TGAGCACCTC TGAGGCCCTG 1080
 1081 CGCATCGACC CTGTGCCCAA CACTCACCCA CTGCTGGTGT TCGTCAACCC TAAGAGCGGC 1140
 1141 GGAAAGCAGG GTCAGAGAGT CCTGTGGAAG TTCCAGTACA TCCTGAACCC ACGCCAGGTG 1200
 1201 TTCAACCTGC TGAAGGACGG CCCTGAGATC GGAATGAGAC TGTCAAGGA CGTGCCCGAC 1260
 1261 TCTCGCATCC TCGTCTGCGG TGGCGACGGT ACTGTGGGAT GGATCCTGGA AACTATCGAC 1320
 1321 AAGGTAACC TGCCAGTGTG GCCACCTGTG GCTGTCTGTC CACTGGGAAC CGGTAACGAC 1380
 1381 CTGGCTCGTT GCCTGCGTGT GGGAGGTGGC TACGAGGGAC AGAACCTGGC CAAGATCCTG 1440
 1441 AAGGACCTGG AAATGAGCAA GGTGGTCCAC ATGGACAGAT GGTCTGTGGA GGTCAATCCA 1500
 1501 CAGCAGACTG AGGAAAAGTC AGACCCAGTC CCTTCCAGA TCATCAACAA CTAATTCAGC 1560
 1561 ATCGGTGTGG ACGCTTCTAT CGCCACAGA TTCCACATCA TCGCGAGAA GTACCCTGAA 1620
 1621 AAGTCAACT CCCGCATGAA GAACAAGCTG TGGTACTTCG AGTTCGCTAC CTCAGAATCC 1680
 1681 ATCTTCTCAA CTGCAAGAA GCTGGAGGAA TCCCTGACCG TCGAGATCTG CGGCAAGCCT 1740
 1741 CTGGACCTGT CAAACCTGTC CCTGGAAGGC ATCGCTGTGC TGAACATCCC AAGCATGCAC 1800
 1801 GGAGTTCTA ACCTCTGGGG CGACACTAGG AGGCCTCAGC GTGACATCTA CGGCATCAAC 1860
 1861 CAGGCCCTGG GAGCTACCGC CAAGTTCATC ACTGACCCCG ACATCCTGAA GACCTGCGTG 1920
 1921 CCAGACCTGA GCGACAAGCG TCTGGAGGTG GTCGGACTGG AGGGTGCCAT CGAAATGGGC 1980
 1981 CAGATCTACA CTAAGCTGAA GAACGCTGGA AGGAGACTGG CCAAGTGTCT TGAGATCACC 2040
 2041 TTCCACACCA CTAAGACTCT GCCTATGCAG ATCGACGGTG AACCTGGAT GCAGACCCCA 2100
 2101 TGCATATCA AGATCACCCA CAAGAACCAG ATGCCCATGC TGATGGGTCC TCCTCTCGC 2160
 2161 TCTGGATCTT CAGAACTGT GAGGTTCAG GGCACCACC ACCACCACCA CTGA 2214

(SEQ ID NO: 5)

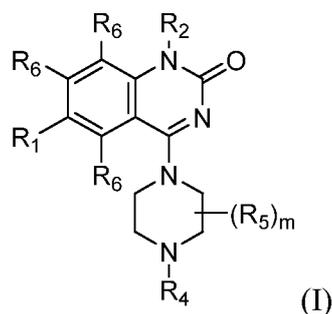
Аминокислотная последовательность MA-hDGK α -(S9-S727)-Ct-TVMV-His:

0001 MASPSDFAQL QKYMEYSTKK VSDVLKLFED GEMAKYVQGD AIGYEGFQQF LKIYLEVDNV 0060
0061 PRHLSLALFQ SFETGHCLNE TNVTKDVVCL NDVSCYFSLLEGGRPEDKLE FTFKLYDTDR 0120
0121 NGILDSSEVD KIILQMMRVA EYLDWDVSEL RPILQEMMKE IDYDGSQSVS QAEWVRAGAT 0180
0181 TVPELLVLLGL EMTLKDDGQH MWRPKRFPRP VYCNLCESSEGLGKQGLSCN LCKYTVHDQC 0240
0241 AMKALPCEVS TYAKSRKDIG VQSHVWVRGG CESGRCDRCQ KKIRIYHSLT GLHCVWCHLE 0300
0301 IHDDCLQAVG HECDGLLRD HILPPSSIYP SVLASGPDRK NSKTSQKTMD DLNLSTSEAL 0360
0361 RIDPVPNTHP LLVFNPKSG GKQGQRVLWK FQYILNPRQV FNLLKDGPEI GLRLEFKDVPD 0420
0421 SRILVCGGDG TVGWILETID KANLPVLPPV AVLPLGTGND LARCLRWGGG YEQNLAKIL 0480
0481 KDLEMSKVH MDRWSVEVIP QQTEEKSDPV PFQIINNYFS IGVDASIAHR FHIMREKYPE 0540
0541 KFNSRMKNKL WYFEFATSES IFSTCKKLEE SLTVEICGKP LDLSNLSLEG IAVLNIPSMH 0600
0601 GGSNLWGDTR RPHGDIYGIN QALGATAKVI TDPDILKTCV PDLSDKRLEV VGLEGAIEMG 0660
0661 QIYTKLKNAG RRLAKSEIT FHTTKTLPMQ IDGEPWMQTP CTIKITHKNQ MPMLMGPPPR 0720
0721 SGSSETVRFQ GHHHHHH 0737

(SEQ ID NO: 6)

Формула изобретения

1. Соединение формулы (I):



или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-\text{CN}$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-4 R_{1a} , $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}_e$ или $-\text{P}(\text{O})\text{R}_e\text{R}_e$;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ или $-\text{NR}_a\text{R}_a$;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1-3} алкил;

каждый R_e независимо представляет собой C_{3-4} циклоалкил или C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} ;

R_2 представляет собой H, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{2a} , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_{2a} , или C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_{2a} ;

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_{1-2}$ алкил), C_{3-4} циклоалкил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_4 представляет собой $-\text{CH}_2\text{R}_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{4a}$, $-\text{CH}_2\text{CHR}_{4a}\text{R}_{4d}$, $-\text{CHR}_{4a}\text{R}_{4b}$ или $-\text{CR}_{4a}\text{R}_{4b}\text{R}_{4c}$;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

- (i) C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_e$ или $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2\text{R}_e$;
- (ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-4} гидроксиалкила, $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-3}$ алкила), C_{1-4} алкокси, $-\text{O}(\text{C}_{1-4}$ гидроксиалкила), $-\text{O}(\text{CH})_{1-3}\text{O}(\text{C}_{1-3}$ алкила), C_{1-3} фторалкокси, $-\text{O}(\text{CH})_{1-3}\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила), $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила) $_2$, $-\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила),

$-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{C}_{3-6}$ циклоалкила), $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}$ (морфолинила), циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (трет-бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d ; или

(iii) C_{1-4} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{NR}_d\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_d\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3}$ алкила), $-\text{NR}_d\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкила) и C_{3-6} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкил, C_{1-3} фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{NR}_c\text{R}_c$ или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} фторалкокси и $-\text{NR}_c\text{R}_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{OH}$, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-\text{CN}$;

R_{4d} представляет собой $-\text{OCH}_3$;

каждый R_c независимо представляет собой H или C_{1-2} алкил;

R_d представляет собой фенил, замещенный 0-1 заместителем, выбранным из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{CH}_3$ и $-\text{OCH}_3$;

каждый R_5 независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-4} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-4 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-4 R_g , $-(\text{CH}_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{NR}_c\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}$ алкил), $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{NR}_c\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4}$ алкил), $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{NR}_c\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-4}$ алкил), $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4}$ алкил),

$-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ алкил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{3-4} \text{ циклоалкил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a\text{R}_a$ или $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a(\text{C}_{3-4} \text{ циклоалкил})$, или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=\text{O}$;

каждый R_g независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-3} алкокси, C_{1-3}

фторалкокси, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-2} \text{ алкил})$, C_{3-5} циклоалкил или $-\text{NR}_c\text{R}_c$;

каждый R_6 представляет собой H, F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CF}_3$ или $-\text{OCH}_3$;

m равно 0, 1, 2 или 3; и

n равно 0, 1 или 2.

2. Соединение по п. 1 или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, Cl, Br, $-\text{CN}$, C_{1-3} алкил, замещенный 0-4 R_{1a} , циклопропил,

замещенный 0-3 R_{1a} , C_{1-3} алкокси, замещенный 0-3 R_{1a} , $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a\text{R}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_a$,

$-\text{S}(\text{O})_n\text{CH}_3$ или $-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$;

каждый R_{1a} независимо представляет собой F, Cl или $-\text{CN}$;

каждый R_a независимо представляет собой H или C_{1-3} алкил;

R_2 представляет собой H, C_{1-2} алкил, замещенный 0-2 R_{2a} , или C_{2-3} алкенил,

замещенный 0-2 R_{2a} ;

каждый R_{2a} независимо представляет собой F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_{1-2} \text{ алкил})$,

циклопропил, C_{3-4} алкенил или C_{3-4} алкинил;

R_{4a} и R_{4b} независимо представляют собой:

(i) C_{1-4} алкил, замещенный 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{SCH}_3$, C_{1-3} фторалкокси и $-\text{NR}_a\text{R}_a$;

(ii) C_{3-6} циклоалкил, гетероциклил, фенил или гетероарил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, C_{1-6} алкила, C_{1-3} фторалкила, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-2} \text{ алкила})$, C_{1-4} алкокси, $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ гидроксиалкила})$, $-\text{O}(\text{CH})_{1-2}\text{O}(\text{C}_{1-2} \text{ алкила})$, C_{1-3} фторалкокси, $-\text{O}(\text{CH})_{1-2}\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-4} \text{ алкила})$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ алкила})$, $-\text{NR}_c\text{R}_c$, $-\text{NR}_a\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3} \text{ алкила})$, $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})(\text{C}_{1-3} \text{ алкила})$, $-\text{NR}_a\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ алкила})$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_{1-2} \text{ алкила})_2$, $-\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-3} \text{ алкила})$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{C}_{3-4} \text{ циклоалкила})$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{морфолинила})$, циклопропила, цианоциклопропила, метилазетидинила, ацетилазетидинила, (*трет*-бутоксикарбонил)азетидинила, триазолила, тетрагидропиридила, морфолинила, тиофенила, метилпиперидинила и R_d ; или

(iii) C_{1-3} алкил, замещенный одной циклической группой, выбранной из C_{3-6} циклоалкила, гетероциклила, фенила и гетероарила, при этом указанная циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-3} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, $-NR_aS(O)_2(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)(C_{1-3}$ алкила), $-NR_aC(O)O(C_{1-4}$ алкила) и C_{3-4} циклоалкила;

или R_{4a} и R_{4b} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил или 3-6-членный гетероциклил, каждый из которых замещен 0-3 R_f ; каждый R_f независимо представляет собой F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-4} алкил, C_{1-2} фторалкил, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси, $-OCH_2CH=CH_2$, $-OCH_2C\equiv CH$, $-NR_cR_c$, или циклическую группу, выбранную из C_{3-6} циклоалкила, 3-6-членного гетероциклила, фенила, моноциклического гетероарила и бициклического гетероарила, при этом каждая циклическая группа замещена 0-3 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, Br, -OH, -CN, C_{1-4} алкила, C_{1-2} фторалкила, C_{1-3} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и $-NR_cR_c$;

R_{4c} представляет собой C_{1-4} алкил или C_{3-6} циклоалкил, каждый из которых замещен 0-4 заместителями, независимо выбранными из F, Cl, -OH, C_{1-2} алкокси, C_{1-2} фторалкокси и -CN;

каждый R_5 независимо представляет собой F, -CN, -OH, C_{1-5} алкил, замещенный 0-4 R_g , C_{1-2} алкокси, замещенный 0-3 R_g , C_{2-3} алкенил, замещенный 0-4 R_g , C_{2-3} алкинил, замещенный 0-4 R_g , C_{3-4} циклоалкил, замещенный 0-4 R_g , фенил, замещенный 0-3 R_g , оксадиазолил, замещенный 0-3 R_g , пиридинил, замещенный 0-3 R_g , $-(CH_2)_{1-2}$ (гетероциклил, замещенный 0-4 R_g), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cC(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-(CH_2)_{1-2}NR_cS(O)_2(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)OH$, $-C(O)O(C_{1-4}$ алкил), $-C(O)O(C_{3-4}$ циклоалкил), $-C(O)NR_aR_a$ или $-C(O)NR_a(C_{3-4}$ циклоалкил), или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют =O;

каждый R_6 представляет собой H, F или $-CH_3$; и

m равно нулю, 1, 2 или 3.

3. Соединение по п. 1 или его соль, где:

R_1 представляет собой H, F, -CN или $-OCH_3$;

R_2 представляет собой H, $-CH_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2CH_2F$ или $-CH_2CH=CH_2$;

R_4 представляет собой $-\text{CH}_2R_{4a}$ или $-\text{CHR}_{4a}R_{4b}$;

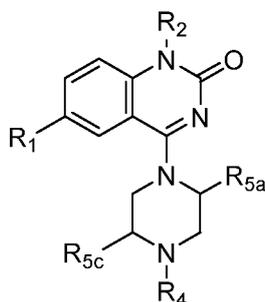
R_{4a} представляет собой фенил, нафталинил или индолил, каждый из которых замещен 0-2 заместителями, независимо выбранными из F, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ и $-\text{OCH}_3$;

R_{4b} представляет собой фенил или фторфенил;

каждый R_5 представляет собой $-\text{CH}_3$, или два R_5 , присоединенные к одному и тому же атому углерода, образуют $=\text{O}$; и

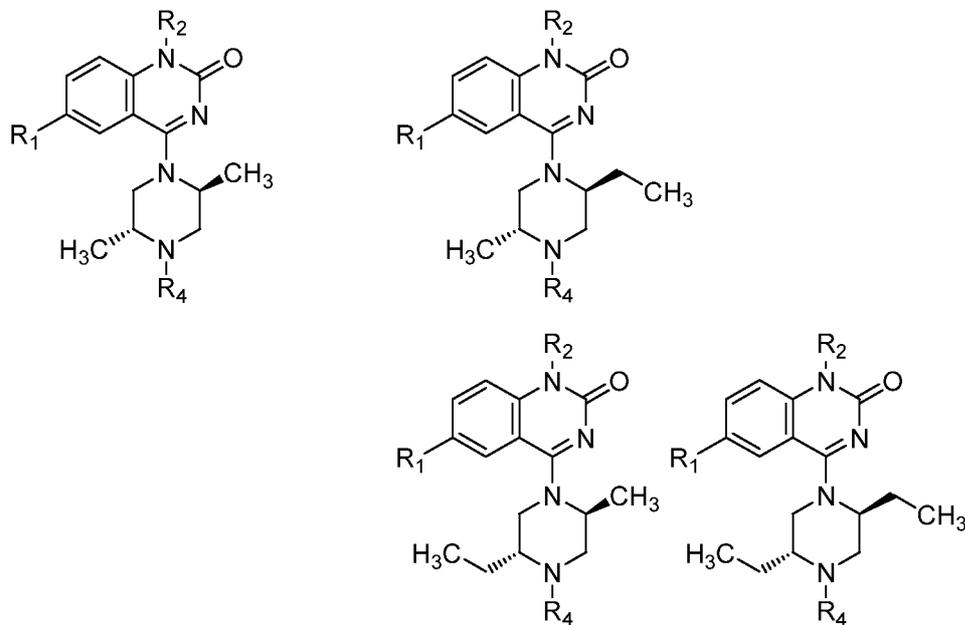
m равно 0, 1 или 2.

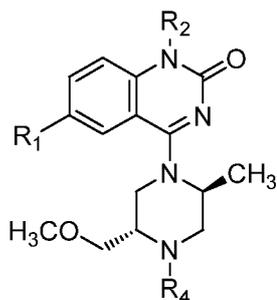
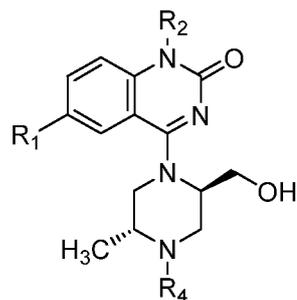
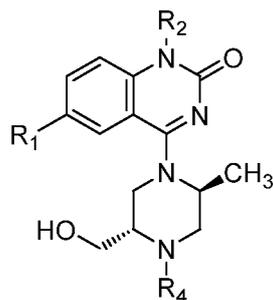
4. Соединение по п. 1 или его соль, имеющее структуру:



где R_{5a} и R_{5c} независимо выбраны из R_5 .

5. Соединение по п. 1 или его соль, имеющее структуру:





или

6. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-\text{CH}_2R_{4a}$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2R_{4a}$.
7. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-\text{CH}_2R_{4a}$.
8. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-\text{CHR}_{4a}R_{4b}$ или $-\text{CR}_{4a}R_{4b}R_{4c}$.
9. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-\text{CHR}_{4a}R_{4b}$.
10. Соединение по п. 1 или его соль, где R_4 представляет собой $-\text{CH}_2R_{4a}$ или $-\text{CHR}_{4a}R_{4b}$.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель.
12. Применение соединения по любому из пп. 1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака или вирусных инфекций.

13. Применение по п. 12, где указанный рак выбран из рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака легких, рака яичников, рака шейки матки, рака почки, рака головы и шеи, лимфомы, лейкоза и меланомы.

14. Применение соединения по любому из пп. 1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для ингибирования активности по меньшей мере одной диацилглицеролкиназы, выбранной из диацилглицеролкиназы альфа ($DGK\alpha$) и диацилглицеролкиназы дзета ($DGK\zeta$).