

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392778 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.06

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.07

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)  
C07D 471/10 (2006.01)  
C07D 207/04 (2006.01)  
A61K 31/5365 (2006.01)  
A61K 31/437 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СОЛЕВАЯ ФОРМА ПИРРОЛОТРИАЗИНОВОГО СОЕДИНЕНИЯ, ЕЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 202110501179.9

(32) 2021.05.08

(33) CN

(86) PCT/CN2022/091452

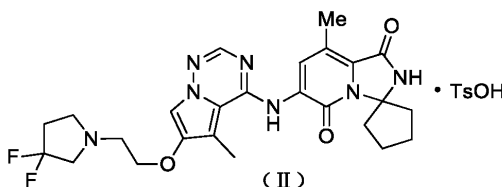
(87) WO 2022/237682 2022.11.17

(71) Заявитель:  
ДЖАМБО ДРАГ БАНК КО., ЛТД.  
(CN)

(72) Изобретатель:  
Бу Линюнь, Вэй Сявэй, Ю Сюй, Сюй Сионбинь, Цзян Нин, Чэнь Шухуэй  
(CN)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к солевой форме пирролотриазинового соединения, ее кристаллической форме, способу ее получения и ее применению, и, в частности, к применению для получения лекарственных средств-ингибиторов MNK1/2 и/или для получения лекарственных средств для лечения колоректального рака.



202392778

A1

A1

202392778

# **СОЛЕВАЯ ФОРМА ПИРРОЛОТРИАЗИНОВОГО СОЕДИНЕНИЯ, ЕЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

## **ПРИОРИТЕТ И РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящее раскрытие изобретения испрашивает приоритет на основании предшествующей заявки, представляющей собой заявку на патент № 202110501179.9 и озаглавленной “СОЛЕВАЯ ФОРМА ПИРРОЛОТРИАЗИНОВОГО СОЕДИНЕНИЯ, ЕЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ”, поданной в Национальное управление интеллектуальной собственности Китая 8 мая 2021 года, включенной в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее раскрытие изобретения относится к солевой форме пирролотриазинового соединения, его кристаллической форме, способу его получения и его применению, и, в частности, к соединению формулы (II) и его кристаллической форме.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Киназа, взаимодействующая с митоген-активируемой протеинкиназой (киназа, взаимодействующая с киназой MAP, или сокращенно MNK), представляет собой серин/треониновую протеинкиназу. Существуют четыре подтипа человеческих MNK, а именно MNK1a и MNK1b, экспрессируемые геном MNK1, и MNK2a и MNK2b, экспрессируемые геном MNK2, соответственно. Все 4 подтипа содержат последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) и последовательность для связывания с эукариотическим фактором инициации трансляции 4G (eIF4G) по N-концу и, таким образом, способны проникать в клеточное ядро для того, чтобы играть роль, а также распознавать и связываться с последующим eIF4E. Подтипы MNK1a и MNK2a содержат сайт связывания MAPK по C-концу и могут быть активированы путем фосфорилирования предшествующей киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK), и митоген-активируемой протеинкиназы p38. Последовательность сигнала ядерного экспорта (NES) по C-концу MNK1a обеспечивает его широкое присутствие в цитоплазме, тогда как другие 3 подтипа главным образом присутствуют в ядре.

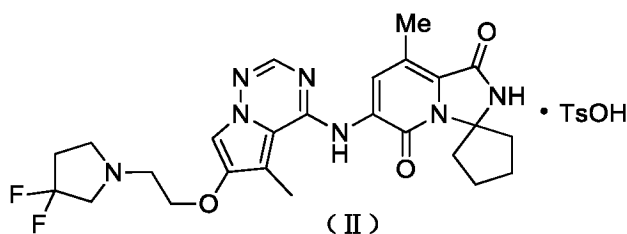
Эукариотический фактор инициации 4E (eIF4E) представляет собой кэп-связывающий белок, и он может специфически распознавать кэп-структуру по 5'-концу

матричной РНК (мРНК) и является важным фактором инициации трансляции белка. Фосфорилированный по S209 eIF4E может способствовать трансляции последующих белков, в основном включающих c-MYC, циклин D1, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF) и антиапоптозные белки, такие как mcl-1 и Bcl-2. Экспрессия eIF4E подвергается повышающей регуляции при раке легкого, колоректальном раке, раке желудка, протоковой карциноме поджелудочной железы и других злокачественных опухолях. MNK является единственной известной киназой, способной фосфорилировать eIF4E. Кроме того, MNK расположена на пересечении множества сигнальных путей, вовлеченных в развитие опухолей и работу иммунной системы, таких как сигнальный путь RAS и Т-клеточный рецептор (TCR), и может избирательно контролировать транскрипцию регуляторов противоопухолевых иммунных ответов. Активность MNK и активация eIF4E являются критическими для развития и прогрессирования опухолей, но не являются необходимыми для нормальных клеток. Таким образом, ожидается, что избирательный ингибитор MNK станет противоопухолевым лекарственным средством, обладающим низкой токсичностью. EFT508 (WO2015/200481; WO2016/172010; WO2017/075394; WO2017/075412; WO2017/087808; WO2017/117052; WO2018/152117; WO2018/218038) представляет собой избирательный ингибитор MNK для перорального введения, разработанный EFFECTOR THERAPEUTICS INC. Исследование продемонстрировало то, что eFT508 может избирательно ингибировать экспрессию белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG3) и интерлейкина 10 (IL-10) и улучшать функцию цитотоксических Т-клеток, не влияя на пролиферацию нормальных Т-клеток. В ходе доклинических исследований было обнаружено то, что комбинация eFT508 и моноклонального антитела против PD-1 может усилить эффективность и увеличить скорость ответа. Была завершена I фаза клинического исследования лекарственного средства, и оно продемонстрировало хорошую безопасность; в настоящее время монотерапия в отношении гематологических опухолей и популярного рака предстательной железы находится во II фазе клинического исследования, комбинированная терапия с применением моноклонального антитела авелумаба в отношении микросателлитно-стабильного колоректального рака (MSS CRC) находится во II фазе клинического исследования, и комбинированная терапия с терапией PD-1/PD-L1 (для пациентов, которых ранее лечили исключительно при помощи терапии PD-1/PD-L1, и

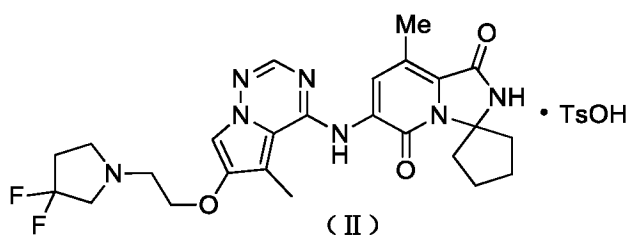
у которых наблюдалось прогрессирование заболевания или отсутствие полного или частичного облегчения) в отношении солидных опухолей находится во II фазе клинического исследования.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем раскрытии изобретения предложено соединение формулы (II),



В настоящем раскрытии изобретения дополнительно предложена кристаллическая форма А соединения формулы (II), где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$  и  $20,58\pm 0,20^\circ$ ;



В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $9,44\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$ ,  $19,84\pm 0,20^\circ$ ,  $20,58\pm 0,20^\circ$ ,  $21,56\pm 0,20^\circ$ ,  $22,86\pm 0,20^\circ$  и  $24,82\pm 0,20^\circ$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $6,58\pm 0,20^\circ$ ,  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $9,44\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$ ,  $14,38\pm 0,20^\circ$ ,  $18,66\pm 0,20^\circ$ ,  $19,84\pm 0,20^\circ$ ,  $20,58\pm 0,20^\circ$ ,  $21,56\pm 0,20^\circ$ ,  $22,86\pm 0,20^\circ$ ,  $23,54\pm 0,20^\circ$  и  $24,82\pm 0,20^\circ$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,78\pm 0,20^\circ$ ,  $6,58\pm 0,20^\circ$ ,  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $9,44\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$ ,  $13,48\pm 0,20^\circ$ ,  $14,38\pm 0,20^\circ$ ,  $14,80\pm 0,20^\circ$ ,  $16,42\pm 0,20^\circ$ ,  $17,00\pm 0,20^\circ$ ,  $17,32\pm 0,20^\circ$ ,  $18,34\pm 0,20^\circ$ ,  $18,66\pm 0,20^\circ$ ,  $19,08\pm 0,20^\circ$ ,

19,60°±0,20°, 19,84°±0,20°, 20,28°±0,20°, 20,58°±0,20°, 21,56°±0,20°, 21,84°±0,20°,  
22,52°±0,20°, 22,86°±0,20°, 23,26°±0,20°, 23,54°±0,20°, 24,46°±0,20°, 24,82°±0,20°,  
25,50°±0,20°, 26,04°±0,20°, 26,58°±0,20°, 27,42°±0,20°, 27,82°±0,20°, 28,07°±0,20°,  
28,42°±0,20°, 29,08°±0,20°, 29,66°±0,20°, 30,08°±0,20°, 31,20°±0,20°, 31,42°±0,20°,  
38,22°±0,20° и 39,04°±0,20°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 4,78°±0,10°, 6,58°±0,10°, 7,78°±0,10°, 9,44°±0,10°, 11,38°±0,10°, 13,48°±0,10°, 14,38°±0,10°, 14,80°±0,10°, 16,42°±0,10°, 17,00°±0,10°, 17,32°±0,10°, 18,34°±0,10°, 18,66°±0,10°, 19,08°±0,10°, 19,60°±0,10°, 19,84°±0,10°, 20,28°±0,10°, 20,58°±0,10°, 21,56°±0,10°, 21,84°±0,10°, 22,52°±0,10°, 22,86°±0,10°, 23,26°±0,10°, 23,54°±0,10°, 24,46°±0,10°, 24,82°±0,10°, 25,50°±0,10°, 26,04°±0,10°, 26,58°±0,10°, 27,42°±0,10°, 27,82°±0,10°, 28,07°±0,10°, 28,42°±0,10°, 29,08°±0,10°, 29,66°±0,10°, 30,08°±0,10°, 31,20°±0,10°, 31,42°±0,10°, 38,22°±0,10° и 39,04°±0,10°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 4,78°, 6,58°, 7,78°, 9,44°, 11,38°, 13,48°, 14,38°, 14,80°, 16,42°, 17,00°, 17,32°, 18,34°, 18,66°, 19,08°, 19,60°, 19,84°, 20,28°, 20,58°, 21,56°, 21,84°, 22,52°, 22,86°, 23,26°, 23,54°, 24,46°, 24,82°, 25,50°, 26,04°, 26,58°, 27,42°, 27,82°, 28,07°, 28,42°, 29,08°, 29,66°, 30,08°, 31,20°, 31,42°, 38,22° и 39,04°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 4,78°±0,20° и/или 6,58°±0,20°, и/или 7,78°±0,20°, и/или 9,44°±0,20°, и/или 11,38°±0,20°, и/или 13,48°±0,20°, и/или 14,38°±0,20°, и/или 14,80°±0,20°, и/или 16,42°±0,20°, и/или 17,00°±0,20°, и/или 17,32°±0,20°, и/или 18,34°±0,20°, и/или 18,66°±0,20°, и/или 19,08°±0,20°, и/или 19,60°±0,20°, и/или 19,84°±0,20°, и/или 20,28°±0,20°, и/или 20,58°±0,20°, и/или 21,56°±0,20°, и/или 21,84°±0,20°, и/или 22,52°±0,20°, и/или 22,86°±0,20°, и/или 23,26°±0,20°, и/или 23,54°±0,20°, и/или 24,46°±0,20°, и/или 24,82°±0,20°, и/или

25,50°±0,20°, и/или 26,04°±0,20°, и/или 26,58°±0,20°, и/или 27,42°±0,20°, и/или 27,82°±0,20°, и/или 28,07°±0,20°, и/или 28,42°±0,20°, и/или 29,08°±0,20°, и/или 29,66°±0,20°, и/или 30,08°±0,20°, и/или 31,20°±0,20°, и/или 31,42°±0,20°, и/или 38,22°±0,20°, и/или 39,04°±0,20°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 4,78°±0,10° и/или 6,58°±0,10°, и/или 7,78°±0,10°, и/или 9,44°±0,10°, и/или 11,38°±0,10°, и/или 13,48°±0,10°, и/или 14,38°±0,10°, и/или 14,80°±0,10°, и/или 16,42°±0,10°, и/или 17,00°±0,10°, и/или 17,32°±0,10°, и/или 18,34°±0,10°, и/или 18,66°±0,10°, и/или 19,08°±0,10°, и/или 19,60°±0,10°, и/или 19,84°±0,10°, и/или 20,28°±0,10°, и/или 20,58°±0,10°, и/или 21,56°±0,10°, и/или 21,84°±0,10°, и/или 22,52°±0,10°, и/или 22,86°±0,10°, и/или 23,26°±0,10°, и/или 23,54°±0,10°, и/или 24,46°±0,10°, и/или 24,82°±0,10°, и/или 25,50°±0,10°, и/или 26,04°±0,10°, и/или 26,58°±0,10°, и/или 27,42°±0,10°, и/или 27,82°±0,10°, и/или 28,07°±0,10°, и/или 28,42°±0,10°, и/или 29,08°±0,10°, и/или 29,66°±0,10°, и/или 30,08°±0,10°, и/или 31,20°±0,10°, и/или 31,42°±0,10°, и/или 38,22°±0,10°, и/или 39,04°±0,10°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения дифрактограмма порошковой рентгеновской дифракции (ПРД (XRPD)) кристаллической формы А, описанной выше, по существу является такой, как продемонстрировано на ФИГ. 1.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения ПРД (XRPD) кристаллической формы А, описанной выше, определяют с использованием излучения Cu-Kα.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения данные анализа дифрактограммы ПРД (XRPD) для кристаллической формы А, описанной выше, продемонстрированы в Таблице 1.

**Таблица 1. Данные анализа ПРД (XRPD) для кристаллической формы А соединения формулы (II)**

№	Угол 2θ (°)	Интенсивность	Межплоскостное	Относительная	№	Угол 2θ (°)	Интенсивность	Межплоскостное	Относительная

		пика (имп./с)	расстоян ие (Å)	интенси вность (%)			ь пика (имп./с )	расстоян ие (Å)	интенси вность (%)
1	4,78	124	18,46	9,8	21	22,52	240	3,94	19,0
2	6,58	104	13,42	8,2	22	22,86	640	3,89	50,6
3	7,78	357	11,35	28,2	23	23,26	301	3,82	23,8
4	9,44	245	9,36	19,3	24	23,54	426	3,78	33,6
5	11,38	1265	7,77	100,0	25	24,46	68	3,64	5,4
6	13,48	93	6,57	7,3	26	24,82	453	3,58	35,8
7	14,38	310	6,15	24,5	27	25,50	93	3,49	7,4
8	14,80	251	5,98	19,8	28	26,04	179	3,42	14,1
9	16,42	137	5,39	10,9	29	26,58	214	3,35	16,9
10	17,00	144	5,21	11,4	30	27,42	97	3,25	7,7
11	17,32	91	5,12	7,2	31	27,82	190	3,20	15,0
12	18,34	291	4,83	23,0	32	28,07	85	3,18	6,7
13	18,66	349	4,75	27,6	33	28,42	81	3,14	6,4
14	19,08	136	4,65	10,8	34	29,08	91	3,07	7,2
15	19,60	269	4,53	21,2	35	29,66	81	3,01	6,4
16	19,84	514	4,47	40,6	36	30,08	90	2,97	7,1
17	20,28	167	4,38	13,2	37	31,20	71	2,86	5,6
18	20,58	726	4,31	57,4	38	31,42	63	2,84	5,0
19	21,56	667	4,12	52,7	39	38,22	36	2,35	2,8
20	21,84	341	4,07	26,9	40	39,04	57	2,31	4,5

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения кривая дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллической формы А, описанной выше, имеет эндотермический пик при  $287,17 \pm 3^\circ\text{C}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК (DSC)) кристаллической формы А, описанной выше, продемонстрирован на ФИГ. 2.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения кривая термогравиметрического анализа (ТГА (TGA)) кристаллической формы А, описанной выше, демонстрирует потерю массы 0,075% при 200,0±3°C.

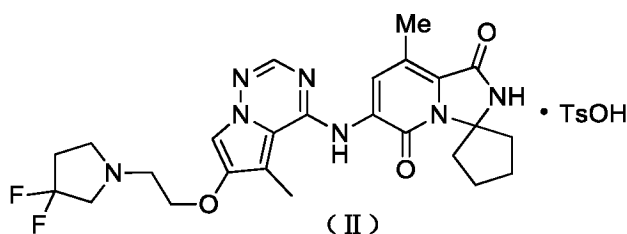
В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения профиль ТГА (TGA) кристаллической формы А, описанной выше, продемонстрирован на ФИГ. 3.

В настоящем раскрытии изобретения дополнительно предложен способ получения кристаллической формы А соединения формулы (II), включающий следующие стадии:

- (а) добавление соединения формулы (II) к растворителю с образованием суспензии;
- (б) перемешивание суспензии при 40-55°C в течение 2-25 ч; и
- (в) фильтрование суспензии и затем сушка осадка на фильтре в вакууме при 30-45°C в течение 10-24 ч;

где растворитель выбран из метанола, ацетонитрила и *трет*-бутилметилового эфира.

В настоящем раскрытии изобретения предложена кристаллическая форма В соединения формулы (II), где дифрактограмма порошковой рентгеновской дифракции (ПРД (XRPD)) кристаллической формы В имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 7,55±0,20°, 15,13±0,20° и 19,82±0,20°;



В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 6,89±0,20°, 7,55±0,20°, 9,50±0,20°, 11,35±0,20°, 12,72±0,20°, 15,13±0,20°, 19,82±0,20° и 26,63±0,20°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах 2θ: 6,89±0,20°, 7,55±0,20°, 9,50±0,20°, 11,35±0,20°, 12,24±0,20°, 12,72±0,20°, 15,13±0,20°, 18,94±0,20°, 19,82±0,20°, 23,25±0,20°, 26,63±0,20° и 27,27±0,20°.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет



характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $6,89^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $7,55^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $8,46^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $9,50^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $10,12^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $11,35^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $12,24^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $12,72^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $14,05^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $15,13^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $15,65^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $16,20^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $17,79^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $18,94^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $19,82^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $20,76^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $21,61^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $23,25^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $23,87^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $26,09^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $26,63^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $27,27^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $28,45^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $29,12^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $30,95^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $32,32^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ ,  $34,62^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$  и  $38,41^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $6,89^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $7,55^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $8,46^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $9,50^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $10,12^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $11,35^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $12,24^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $12,72^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $14,05^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $15,13^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $15,65^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $16,20^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $17,79^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $18,94^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $19,82^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $20,76^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $21,61^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $23,25^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $23,87^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $26,09^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $26,63^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $27,27^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $28,45^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $29,12^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $30,95^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $32,32^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ ,  $34,62^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$  и  $38,41^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^{\circ}$ ,  $6,89^{\circ}$ ,  $7,55^{\circ}$ ,  $8,46^{\circ}$ ,  $9,50^{\circ}$ ,  $10,12^{\circ}$ ,  $11,35^{\circ}$ ,  $12,24^{\circ}$ ,  $12,72^{\circ}$ ,  $14,05^{\circ}$ ,  $15,13^{\circ}$ ,  $15,65^{\circ}$ ,  $16,20^{\circ}$ ,  $17,79^{\circ}$ ,  $18,94^{\circ}$ ,  $19,82^{\circ}$ ,  $20,76^{\circ}$ ,  $21,61^{\circ}$ ,  $23,25^{\circ}$ ,  $23,87^{\circ}$ ,  $26,09^{\circ}$ ,  $26,63^{\circ}$ ,  $27,27^{\circ}$ ,  $28,45^{\circ}$ ,  $29,12^{\circ}$ ,  $30,95^{\circ}$ ,  $32,32^{\circ}$ ,  $34,62^{\circ}$  и  $38,41^{\circ}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$  и/или  $6,89^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $7,55^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $8,46^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $9,50^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $10,12^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $11,35^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $12,24^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $12,72^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $14,05^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $15,13^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $15,65^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $16,20^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $17,79^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $18,94^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $19,82^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $20,76^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $21,61^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $23,25^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $23,87^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $26,09^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $26,63^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $27,27^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $28,45^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $29,12^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $30,95^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $32,32^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $34,62^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ , и/или  $38,41^{\circ}\pm 0,20^{\circ}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В, описанной выше, имеет характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$  и/или  $6,89^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $7,55^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $8,46^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $9,50^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $10,12^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $11,35^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $12,24^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $12,72^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $14,05^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $15,13^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $15,65^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $16,20^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $17,79^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $18,94^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $19,82^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $20,76^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $21,61^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $23,25^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $23,87^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $26,09^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $26,63^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $27,27^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $28,45^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $29,12^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $30,95^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $32,32^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $34,62^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ , и/или  $38,41^{\circ}\pm 0,10^{\circ}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения дифрактограмма ПРД (XPRD) кристаллической формы В, описанной выше, по существу является такой, как продемонстрировано на ФИГ. 4.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения ПРД (XPRD) кристаллической формы В, описанной выше, определяют с использованием излучения  $\text{Cu-K}\alpha$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения данные анализа дифрактограммы ПРД (XPRD) для кристаллической формы В, описанной выше, продемонстрированы в Таблице 2.

**Таблица 2. Данные анализа ПРД (XPRD) для кристаллической формы В соединения формулы (II)**

№	Угол $2\theta$ (°)	Интенсивность пика (имп./с)	Межплоскостное расстояние (Å)	Относительная интенсивность (%)	№	Угол $2\theta$ (°)	Интенсивность пика (имп./с)	Межплоскостное расстояние (Å)	Относительная интенсивность (%)
1	4,98	72,32	17,74	2,97	16	19,82	1532,59	4,48	62,93
2	6,89	896,22	12,82	36,80	17	20,76	150,45	4,28	6,18
3	7,55	1530,49	11,71	62,85	18	21,61	244,84	4,11	10,05

4	8,46	157,42	10,46	6,46	19	23,25	347,03	3,83	14,25
5	9,50	859,72	9,31	35,30	20	23,87	274,20	3,73	11,26
6	10,12	135,06	8,74	5,55	21	26,09	263,02	3,42	10,80
7	11,35	889,45	7,80	36,52	22	26,63	913,50	3,35	37,51
8	12,24	510,42	7,23	20,96	23	27,27	351,00	3,27	14,41
9	12,72	666,73	6,96	27,38	24	28,45	138,33	3,14	5,68
10	14,05	259,16	6,31	10,64	25	29,12	70,84	3,07	2,91
11	15,13	2435,2 5	5,86	100,00	26	30,95	54,09	2,89	2,22
12	15,65	242,34	5,66	9,95	27	32,32	32,02	2,77	1,31
13	16,20	272,35	5,47	11,18	28	34,62	16,98	2,59	0,70
14	17,79	95,51	4,99	3,92	29	38,41	68,55	2,34	2,81
15	18,94	579,19	4,69	23,78					

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения кривая дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллической формы В, описанной выше, имеет эндотермический пик при  $300,0 \pm 3^\circ\text{C}$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения профиль ДСК (DSC) кристаллической формы В, описанной выше, продемонстрирован на ФИГ. 5.

В настоящем раскрытии изобретения дополнительно предложен способ получения кристаллической формы В соединения формулы (II), включающий следующие стадии:

(а) добавление соединения формулы (II) к растворителю с образованием суспензии;

(б) перемешивание суспензии при  $40\text{-}55^\circ\text{C}$  в течение 2-25 ч; и

(в) фильтрование суспензии и затем сушка осадка на фильтре в вакууме при  $30\text{-}45^\circ\text{C}$  в течение 10-24 ч;

где растворитель выбран из этанола и *n*-гептана.

В настоящем раскрытии изобретения дополнительно предложено применение соединения формулы (II), описанного выше, кристаллической формы А, описанной выше, и кристаллической формы В, описанной выше, или кристаллических форм, полученных при помощи способа, описанного выше, для приготовления лекарственного средства-ингибитора MNK1/2.

В настоящем раскрытии изобретения дополнительно предложено применение

соединения формулы (II), описанного выше, кристаллической формы А, описанной выше, и кристаллической формы В, описанной выше, или кристаллических форм, полученных при помощи способа, описанного выше, для приготовления лекарственного средства для лечения колоректального рака.

### **Технические результаты**

Соединение формулы (I) в соответствии с настоящим раскрытием изобретения обладает высокой селективностью в отношении MNK1/2, а также обладает значительной ингибирующей активностью в отношении киназ; кроме того, соединение обладает хорошей мембранной проницаемостью и обладает превосходными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Каждая из кристаллических форм соединения формулы (II) является стабильной, мало подвержена воздействию света, тепла и влажности и обладает хорошей эффективностью *in vivo* и широкой фармацевтической перспективой.

### **Определения и описание**

Если не указано иное, то предполагается, что следующие термины и фразы, используемые в настоящем описании, имеют следующие значения. Если специально не указано иное, то конкретную фразу или термин не следует рассматривать как неопределенную или неясную, а следует толковать в соответствии с ее общепринятым значением. Предполагается, что когда речь идет о товарном знаке, тогда он относится к соответствующему коммерческому продукту или его активному ингредиенту.

Промежуточные соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения могут быть получены при помощи различных способов синтеза, хорошо известных специалистам в данной области техники, включая перечисленные ниже конкретные варианты реализации, варианты реализации, полученные путем их комбинаций с другими способами химического синтеза, и их эквивалентные замены, известные специалистам в данной области техники. Предпочтительные варианты реализации включают примеры, раскрытые в настоящем описании.

Химические реакции в соответствии с конкретными вариантами реализации настоящего раскрытия изобретения осуществляют в подходящем растворителе, который должен быть подходящим для химических изменений в соответствии с настоящим раскрытием изобретения и требуемых реактивов и материалов. Для получения соединений в соответствии с настоящим раскрытием изобретения специалистам в данной области

техники иногда необходимо модифицировать или выбрать процедуру синтеза или схему реакции на основе существующих вариантов реализации.

Структуры соединений в соответствии с настоящим раскрытием изобретения могут быть подтверждены при помощи традиционных способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, и, если настоящее раскрытие изобретения относится к абсолютной конфигурации соединения, тогда указанная абсолютная конфигурация может быть подтверждена при помощи обычных в данной области техники способов. Например, в способе монокристалльной рентгеновской дифракции (МРД (SXRД)) собирают данные об интенсивности дифракции выращенного монокристалла с помощью дифрактометра Bruker D8 venture, в котором источником света является излучение  $\text{CuK}\alpha$ , а режим сканирования представляет собой сканирование  $\varphi/\omega$ ; после сбора соответствующих данных для анализа кристаллической структуры дополнительно используют прямой метод (Shelxs97), и, таким образом, может быть подтверждена абсолютная конфигурация.

Настоящее раскрытие изобретения подробно описано ниже при помощи примеров, которые никоим образом не предназначены для ограничения настоящего раскрытия изобретения.

Все растворители, используемые в настоящем раскрытии изобретения, имеются в продаже и могут быть использованы без дополнительной очистки.

В настоящем раскрытии изобретения используются следующие сокращения: DCM представляет собой дихлорметан; DMF представляет собой *N,N*-диметилформамид; DMSO представляет собой диметилсульфоксид; EtOH представляет собой этанол; MeOH представляет собой метанол; 2-MeTHF представляет собой 2-метилтетрагидрофуран; ACN представляет собой ацетонитрил; толуол представляет собой метилбензол; EtOAc представляет собой этилацетат; THF представляет собой тетрагидрофуран;  $\text{H}_2\text{O}$  представляет собой воду; TosOH представляет собой *para*-толуолсульфоновую кислоту.

Соединения названы в соответствии с общепринятыми правилами номенклатуры в данной области техники или с использованием программного обеспечения ChemDraw<sup>®</sup>, и для соединений, имеющих в продаже, приведены названия в соответствии с каталогами поставщиков.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

ФИГ. 1 демонстрирует дифрактограмму ПРД (XRPD) кристаллической формы А

соединения формулы (II);

ФИГ. 2 демонстрирует профиль ДСК (DSC) кристаллической формы А соединения формулы (II);

ФИГ. 3 демонстрирует профиль ТГА (TGA) кристаллической формы А соединения формулы (II);

ФИГ. 4 демонстрирует дифрактограмму ПРД (XRPD) кристаллической формы В соединения формулы (II);

ФИГ. 5 демонстрирует профиль ДСК (DSC) кристаллической формы В соединения формулы (II);

ФИГ. 6 демонстрирует профиль динамической сорбции паров (ДСП (DVS)) кристаллической формы А соединения формулы (II); и

ФИГ. 7 демонстрирует эллипсоидный график монокристалла соединения формулы (II).

### **Параметры прибора**

**Способ для порошкового рентгеновского дифрактометра (ПРД (XRPD)) для кристаллической формы А в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 3.**

**Таблица 3. Параметры тестирования ПРД (XRPD) для кристаллической формы**

**А**

Параметры тестирования ПРД (XRPD)	
Параметр	Установленное значение
Модель	DX-2700BH
Рентгеновское излучение	Cu, k- $\alpha$ : 1,54184Å;
Настройки рентгеновской трубки	40 кВ, 30 мА
Щель расходимости	1 мм
Первичная рассеивающая щель	28 мм
Вторичная щель	28 мм

Параметры тестирования ПРД (XPRD)	
Параметр	Установленное значение
Щель детектора	0,3 мм
Противорассеивающая щель	1 мм
Ось сканирования	$\theta_s-\theta_d$
Диапазон сканирования $2\theta$ (°)	3-40
Время сканирования (с)	0,5
Размер шага сканирования $2\theta$ (°)	0,02

**Способ для дифференциального сканирующего калориметра (ДСК (DSC)) для кристаллической формы А в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 4.**

**Таблица 4. Параметры тестирования ДСК (DSC) для кристаллической формы А**

Параметры тестирования ДСК (DSC)	
Модель прибора	Mettler DSC1
Способ	Линейное нагревание
Тип тигля	Позолоченный тигель высокого давления, закрытый
Диапазон температур	40-350°C
Скорость сканирования (°C/мин)	10
Защитный газ	Азот

**Способ для термогравиметрического анализатора (ТГА (TGA)) для кристаллической формы А в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 5.**

**Таблица 5. Параметры тестирования ТГА (TGA) для кристаллической формы**

**А**

Параметры тестирования ТГА (TGA)	
Модель прибора	TGA 550
Способ	Линейное нагревание
Лоток для образцов	Алюминиевый лоток, открытый
Диапазон температур	40-500°C
Скорость сканирования (°C/мин)	10
Защитный газ	Азот

**Способ динамической сорбции паров ДСП (DVS) для кристаллической формы А в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 6.**

**Таблица 6. Параметры тестирования ДСП (DVS) для кристаллической формы**

**А**

Производитель и модель прибора	SMS/DVS intrinsic
Условие тестирования	Взвешивание приблизительно 10 мг образца для тестирования
Температура	25°C
Уравновешивание	$\Delta$ масс./ $\Delta$ темп.: 0,01%/мин
Сушка	Сушка при 25°C и относительной влажности (ОВ) 0% в течение 2 ч
Градиент тестирования ОВ (%)	5% ОВ
Диапазон градиента тестирования ОВ (%)	0%-95%-0% ОВ



Категории оценки гигроскопичности продемонстрированы в Таблице 7 ниже:

Таблица 7. Таблица категорий оценки гигроскопичности

Категории гигроскопичности	$\Delta W\%$
Поглощение влаги	Абсорбция достаточного количества воды для образования раствора
Очень гигроскопичный	$\Delta W\% \geq 15\%$
Гигроскопичный	$15\% > \Delta W\% \geq 2\%$
Слегка гигроскопичный	$2\% > \Delta W\% \geq 0,2\%$
Негигроскопичный или едва гигроскопичный	$\Delta W\% < 0,2\%$

Примечание:  $\Delta W\%$  представляет собой гигроскопическое увеличение массы тестируемого соединения при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $80 \pm 2\%$  ОВ.

Способ для рентгеновского порошкового дифрактометра РПД (XRPD) для кристаллической формы В в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 8.

Таблица 8: Параметры тестирования РПД (XRPD) для кристаллической формы В

Параметры тестирования РПД (XRPD)	
Параметр	Установленное значение
Модель	X'Pert <sup>3</sup>
Рентгеновское излучение	Cu, $K\alpha$ , $K\alpha_1$ (Å): 1,54060; $K\alpha_2$ (Å): 1,54443;
Настройки рентгеновской трубки	45 кВ, 40 мА
Щель расходимости	Фиксированная $1/8^\circ$
Противорассеивающая щель	P7,5
Режим сканирования	Непрерывный
Диапазон сканирования	3-40

2θ (°)	
Время сканирования каждого шага (с)	46,665
Размер шага сканирования 2θ (°)	0,0263

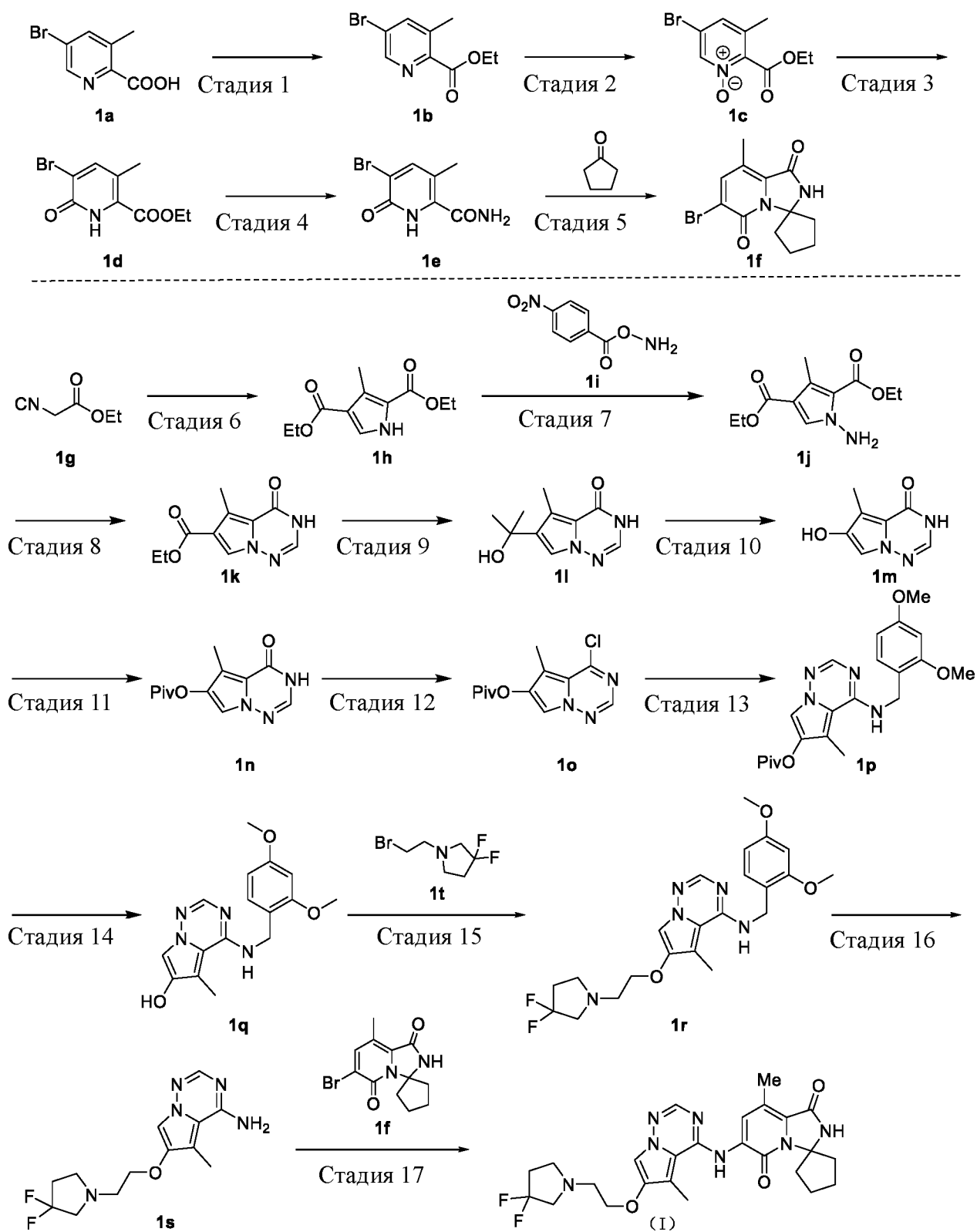
**Способ для дифференциального сканирующего калориметра (ДСК (DSC)) для кристаллической формы В в соответствии с настоящим раскрытием изобретения имеет параметры тестирования, продемонстрированные в Таблице 9.**

**Таблица 9: Параметры тестирования ДСК (DSC) для кристаллической формы В**

Параметры тестирования ДСК (DSC)	
Модель прибора	TA Discovery DSC 2500
Способ	Линейное нагревание
Лоток для образцов	Алюминиевый лоток, закрытый
Диапазон температур	25-330°C
Скорость сканирования (°C/мин)	10
Защитный газ	Азот

**Пример 1: Получение соединения формулы (I),**

Путь синтеза:



Стадия 1

Соединение **1a** (100 г, 462 ммоль) растворяли в этаноле (500 мл), и по каплям при 0°C добавляли концентрированную серную кислоту (49,94 г, 509 ммоль, чистота: 98%). Полученную реакционную жидкость перемешивали при 95°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении

для удаления большей части этанола. К полученному концентрату добавляли воду (300 мл), и полученный смешанный раствор экстрагировали этилацетатом (250 мл × 3). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения **1b**. <sup>1</sup>H Ядерный магнитный резонанс <sup>1</sup>H (ЯМР (NMR)) (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,60 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 4,48-4,42 (m, 2H), 2,58 (s, 3H), 1,43 (t, *J*=7,2 Гц, 3H).

#### Стадия 2

Соединение **1b** (10,0 г, 41,0 ммоль) растворяли в дихлорметане (200 мл), и при перемешивании при 0°C добавляли трифторуксусный ангидрид (17,2 г, 81,9 ммоль) и пероксигидрат мочевины (8,09 г, 86,0 ммоль). Полученную реакционную жидкость нагревали до 25°C и перемешивали в течение 16 ч. К реакционной жидкости добавляли воду (200 мл), и смешанный раствор экстрагировали дихлорметаном (100 мл×3). Органические фазы объединяли, последовательно промывали насыщенным бикарбонатом натрия (200 мл × 2) и насыщенным рассолом (500 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения **1c**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,23 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 4,52-4,45 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,41 (t, *J*=7,2 Гц, 3H).

#### Стадия 3

Соединение **1c** (22,0 г, 84,6 ммоль) растворяли в *N,N*-диметилформамиде (130 мл), и при перемешивании при 0°C добавляли трифторуксусный ангидрид (35,5 г, 169 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при 50°C в течение 1 ч. К реакционной жидкости добавляли воду (200 мл), и полученный смешанный раствор экстрагировали этилацетатом (100 мл × 4). Органические фазы объединяли, последовательно промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (200 мл × 3) и насыщенным рассолом (150 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт добавляли к смешанной жидкости, состоящей из петролейного эфира и этилацетата (8/1, 90 мл), и эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем фильтровали с получением соединения **1d**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,89 (br. s, 1H), 7,75 (s, 1H), 4,46-4,41 (m, 2H), 2,44 (s, 3H), 1,43 (t, *J*=7,2 Гц, 3H).

#### Стадия 4

Соединение **1d** (2,00 г, 7,69 ммоль) растворяли в этаноле (20 мл) и добавляли водный аммиак (16,2 г, 115 ммоль, чистота: 25%). Полученную реакционную жидкость перемешивали при 40°C в течение 16 ч. Реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении, и неочищенный продукт добавляли к смешанной жидкости, состоящей из метанола и дихлорметана (1/5, 48 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего фильтровали и промывали дихлорметаном (5 мл × 2). Осадок на фильтре концентрировали при пониженном давлении с получением соединения **1e**. Масс-спектрометрия с ионизацией путем распыления электронов (МС-ИРЭ (MS-ESI)),  $[M+H]^+$ , рассчитано: 231 и 233, обнаружено 231 и 233.

#### Стадия 5

Соединение **1e** (500 мг, 1,97 ммоль) и циклопентанон (664 мг, 7,89 ммоль) растворяли в безводном диоксане (6 мл), и к реакционной жидкости по каплям добавляли концентрированную серную кислоту (98,7 мг, 0,986 ммоль, чистота: 98%). Реакционную жидкость перемешивали при 95°C в течение 3 ч. Реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении для удаления части диоксана (приблизительно 3 мл), а затем фильтровали. К собранному осадку на фильтре добавляли *n*-гексан (10 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и фильтровали. Осадок на фильтре сушили под вакуумом в течение 2 ч с получением соединения **1f**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 297 и 299, обнаружено: 297 и 299. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 10,16 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 2,71-2,78 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,91-1,93 (m, 2H), 1,79-1,84 (m, 2H), 1,63-1,67 (m, 2H).

#### Стадия 6

Соединение **1g** (50 г, 0,442 моль), 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (67,3 г, 0,442 моль) растворяли в тетрагидрофуране (500 мл). Реакционную жидкость нагревали до 55°C, и при этой температуре к реакционной жидкости добавляли ацетальдегид (9,74 г, 0,221 моль). Реакционную жидкость перемешивали при 55°C в течение 18 ч. Затем реакционную жидкость охлаждали до 22°C и гасили уксусной кислотой (25 мл). Реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении, и остаток растворяли в этилацетате (1000 мл) и разбавленной соляной кислоте (1000 мл, 1M). Органическую фазу сохраняли после разделения жидкости, а водную фазу экстрагировали этилацетатом (300 мл × 3).

Органические фазы объединяли, последовательно промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (100 мл) и рассолом (200 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, и неочищенный продукт разделяли с помощью колоночной хроматографии (4/1, петролейный эфир/этилацетат,  $R_f = 0,56$ ) с получением соединения **1h**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 226, обнаружено: 226.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,29 (br. s, 1H), 7,48 (d,  $J=3,2$  Гц, 1H), 4,35 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 4,29 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,61 (s, 3H), 1,38 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,35 (m,  $J=7,2$  Гц, 3H).

#### Стадия 7

Соединение **1h** (11,0 г, 48,8 ммоль) растворяли в *N*-метилпирролидоне (60 мл), и к реакционной жидкости добавляли *трет*-бутоксид калия (6,03 г, 53,7 ммоль). После того, как реакционную жидкость перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч, добавляли раствор соединения **1i** (9,78 г, 53,7 ммоль) в *N*-метилпирролидоне (30 мл). Реакционную жидкость дополнительно перемешивали в течение 20 ч. Реакционную жидкость промывали водой (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (200 мл  $\times$  3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (20 мл  $\times$  3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, и неочищенный продукт разделяли с помощью колоночной хроматографии (4/1, петролейный эфир/этилацетат,  $R_f = 0,55$ ) с получением соединения **1j**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 241, обнаружено: 241.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,49 (s, 1H), 4,35 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 4,27 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,57 (s, 3H), 1,40 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,34 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H).

#### Стадия 8

Соединение **1j** (10,2 г, 42,5 ммоль) растворяли в формамиде (120 мл), и к реакционной жидкости добавляли фосфорную кислоту (832 мг, 8,49 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при 125°C в течение 16 ч. Затем реакционную жидкость охлаждали до 22°C, и из нее выпадало в осадок большое количество белого твердого вещества. Смесь фильтровали, и собранный осадок на фильтре добавляли к смешанному раствору петролейного эфира/этилацетата (1/1, 100 мл). Полученную в результате смесь перемешивали при 30°C в течение 0,5 ч, а затем фильтровали с получением соединения **1k**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 222, обнаружено: 222.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  7,90 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 4,23 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,61 (s, 3H), 1,28 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H).

#### Стадия 9

Соединение **1k** (4,00 г, 18,0 ммоль) растворяли в безводном тетрагидрофуране (50 мл). К реакционной жидкости по каплям при 25°C добавляли метилмагнийбромид (30,1 мл, 90,3 ммоль). После завершения добавления по каплям реакционную жидкость нагревали до 25°C и перемешивали в течение 15 ч. Реакционную жидкость гасили насыщенным раствором хлорида аммония (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл × 5). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (10 мл × 1), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, и неочищенный продукт разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (2/1, петролейный эфир/этилацетат, R<sub>f</sub> = 0,39) с получением соединения **1l**.

МС-ИРЭ, [M+H]<sup>+</sup>, рассчитано: 208, обнаружено: 208. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,30 (br s, 1H), 7,24 (br s, 1H), 2,59 (s, 3H), 1,54 (s, 6H).

#### Стадия 10

Соединение **1l** (1,00 г, 4,83 ммоль) и перекись водорода (4,64 мл, 48,26 ммоль, содержание: 30%) растворяли в безводном тетрагидрофуране (30 мл). К реакционной жидкости при 0°C по каплям добавляли холодный раствор метансульфоновой кислоты (3,44 мл, 48,26 ммоль) в воде (10 мл). Реакционную жидкость перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Реакционную жидкость гасили 10% водным раствором сульфита натрия (15 мл) до тех пор, пока йодкрахмальная реактивная бумага не продемонстрировала отрицательный результат. Раствор экстрагировали этилацетатом (50 мл × 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (10 мл × 1), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, и неочищенный продукт разделяли с помощью колоночной хроматографии (2/1, петролейный эфир/этилацетат, R<sub>f</sub> = 0,38) с получением соединения **1m**. МС-ИРЭ, [M+H]<sup>+</sup>, рассчитано: 166, обнаружено: 166.

#### Стадия 11

Соединение **1m** (400 мг, 2,42 ммоль) растворяли в безводном тетрагидрофуране (10 мл), и к реакционной жидкости добавляли триэтиламин (0,674 мл, 4,84 ммоль) и пивалоилхлорид (350 мг, 4,84 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при 0°C в течение 1 ч, промывали водой (10 мл) и экстрагировали этилацетатом (10 мл × 5). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (10 мл × 1), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении,

и неочищенный продукт разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (2/1, петролейный эфир/этилацетат,  $R_f = 0,63$ ) с получением соединения **1n**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 250, обнаружено: 250.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7,61 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,38 (s, 9H).

#### Стадия 12

Соединение **1n** (450 мг, 1,81 ммоль) растворяли в оксихлориде фосфора (8,85 мл). Реакционную жидкость перемешивали при 100°C в течение 1 ч. Затем реакционную жидкость охлаждали до комнатной температуры и выливали в насыщенный раствор бикарбоната аммония (300 мл). Смесь экстрагировали дихлорметаном (50 мл  $\times$  3), и органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (20 мл  $\times$  1), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением соединения **1o**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 268, обнаружено: 268.

#### Стадия 13

Соединение **1o** (2,00 г, 7,47 ммоль), 2,4-диметоксибензиламин (1,87 г, 11,21 ммоль) и триэтиламин (2,27 г, 22,4 ммоль) растворяли в безводном тетрагидрофуране (30 мл). Реакционную жидкость перемешивали при 70°C в течение 1 ч. Затем реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения **1p**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 399, обнаружено: 399.

#### Стадия 14

Соединение **1p** (3,50 г, 8,78 ммоль) растворяли в метаноле (3 мл) и тетрагидрофуране (20 мл), и к реакционной жидкости добавляли раствор гидроксида натрия (703 мг, 17,6 ммоль) в воде (20 мл). Реакционную жидкость перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. Реакционную жидкость концентрировали для удаления органического растворителя, и pH водной фазы доводили до 7 с помощью разбавленного водного раствора соляной кислоты (1M), и смесь экстрагировали дихлорметаном (50 мл  $\times$  3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным рассолом (10 мл  $\times$  1), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, и неочищенный продукт разделяли с помощью колоночной хроматографии (2/1, петролейный эфир/этилацетат,  $R_f = 0,32$ ) с получением соединения **1q**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 315, обнаружено: 315.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7,67 (s, 1H), 7,21 (d,  $J=8,4$  Гц, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,56 (d,  $J=2,4$  Гц, 1H), 6,47 (dd,  $J=2,4, 8,4$  Гц, 1H), 4,66 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 2,36 (s, 3H).



#### Стадия 15

Соединение **1t** (250 мг, 795 мкмоль) растворяли в *N,N*-диметилформамиде (4 мл), а затем добавляли соединение **1q** (187 мг, 875 мкмоль) и гидроксид натрия (63,6 мг, 1,59 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при 50°C в течение 0,5 ч. После завершения реакции к реакционной жидкости для разбавления добавляли воду (50 мл), и смешанный раствор экстрагировали этилацетатом (30 мл × 3). Объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разделяли с помощью колоночной хроматографии (1:1, петролейный эфир/этилацетат,  $R_f = 0,1$ ) с получением соединения **1r**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 448, обнаружено: 448.

#### Стадия 16

Соединение **1r** (300 мг, 670 мкмоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (3,0 мл), и реакционную жидкость перемешивали при 100°C в течение 1 ч. После завершения реакции реакционную жидкость концентрировали, и остаток очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (система на основе соляной кислоты) с получением гидрохлорида соединения **1s**. МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 298, обнаружено: 298.

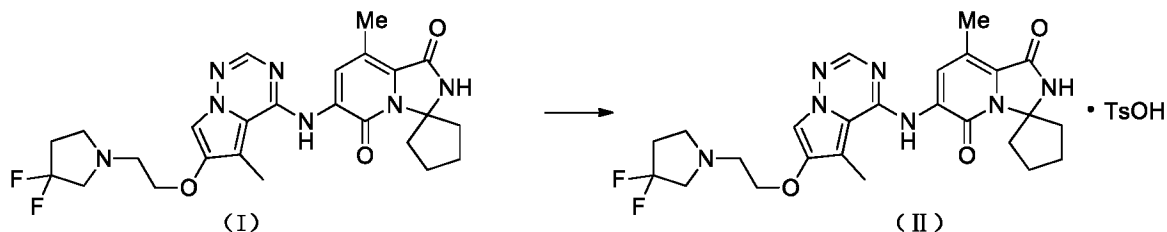
#### Стадия 17

Хлоргидрат соединения **1s** (90 мг) и соединение **1f** (72 мг, 241 мкмоль) растворяли в безводном диоксане (2 мл), а затем добавляли карбонат цезия (250 мг, 766 мкмоль) и метансульфонат(2-дициклогексилфосфино-3,6-диметокси-2,4,6-триизопропил-1,1-бифенил)(2-амино-1,1-бифенил-2-ил)палладий(II) (20 мг, 21,9 мкмоль). Реакционную жидкость перемешивали при 105°C в течение 12 ч в атмосфере азота. Реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении, и остаток разделяли и очищали с помощью колоночной хроматографии (10:1, дихлорметан/метанол,  $R_f = 0,3$ ) с получением неочищенного соединения. К неочищенному продукту добавляли смешанный раствор метанола и этанола (4/1, 10 мл), и смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч и фильтровали. Остаток на фильтре промывали метанолом (2 мл × 2) и водой (2 мл × 2), а затем сушили с получением соединения формулы (I). МС-ИРЭ,  $[M+H]^+$ , рассчитано: 514, обнаружено: 514.  $^1H$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  10,00 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 4,08 (t,  $J=5,6$  Гц, 2H), 3,00 (t,  $J=13,5$  Гц, 2H), 2,91-2,78 (m, 6H), 2,47 (s,

3H), 2,46 (s, 3H), 2,31-2,18 (m, 2H), 2,04-1,92 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,76-1,62 (m, 2H).

### Пример 2: Получение соединения формулы (II) и выращивание его монокристалла

Путь синтеза:



Стадия 1

Соединение формулы (I) (2 г, 3,89 мкмоль) и гексафторизопропанол (40 мл) перемешивали и хорошо смешивали, и к раствору добавляли моногидрат *para*-толуолсульфоновой кислоты (814,89 мг, 4,28 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при 40°C в течение 3 ч и по каплям добавляли к изопропанолу (160 мл). Смешанный раствор фильтровали, и осадок на фильтре сушили под вакуумом с получением соединения формулы (II). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 10,02 (s, 1H), 8,86 (br s, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,0 Гц, 2H), 7,10 (d, *J* = 8,0 Гц, 2H), 4,31 (br d, *J* = 4,4 Гц, 2H), 4,08 - 3,62 (m, 6H), 2,89 - 2,78 (m, 2H), 2,72 - 2,57 (m, 2H), 2,51 (br s, 3H), 2,46 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 1,95-1,97 (m, 2H), 1,89 - 1,79 (m, 2H), 1,73 - 1,64 (m, 2H). МС-ИРЭ, [M+H]<sup>+</sup>, рассчитано: 514, обнаружено: 514.

Подходящее количество соединения формулы (II) при комнатной температуре растворяли в 1 мл дихлорметана/метанола (1:1), и раствор образца помещали в полужакрытый флакон для образца объемом 4 мл для того, чтобы растворители медленно улетучивались при комнатной температуре. На следующие сутки был получен бесцветный массивный кристалл, и его тестировали при помощи способа монокристаллической рентгеновской дифракции. Результаты анализа монокристаллической структуры продемонстрированы на ФИГ. 7.

### Пример 3: Получение кристаллической формы А соединения формулы (II)

В реактор последовательно добавляли ацетонитрил (7,0 л), соединение формулы (I) (700,22 г) и моногидрат *para*-толуолсульфоновой кислоты (272,25 г), при этом внутреннюю температуру поддерживали на уровне 20-30°C. Внутреннюю температуру реактора увеличивали до 45-55°C, и реакционную жидкость перемешивали в течение 4,5 ч и

фильтровали. Осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (0,7 л). Полученный в результате осадок на фильтре переносили в реактор, добавляли ацетонитрил (7,0 л), затем реакционную жидкость перемешивали при 45-55°C в течение 20 ч и фильтровали. Осадок на фильтре последовательно промывали ацетонитрилом (0,7 л) и *трет*-бутилметилловым эфиром (1,4 л) и сушили под вакуумом и при пониженном давлении при температуре не выше 45°C и давлении не более чем -0,1 МПа в течение 17 ч с получением кристаллической формы А соединения формулы (II). Результаты обнаружения ПРД (XRPD), ДСК (DSC) и ТГА (TGA) продемонстрированы на ФИГ. 1, ФИГ. 2 и ФИГ. 3.

**Пример 4: Скрининговый тест кристаллической формы соединения формулы (II) в различных растворителях**

Отдельно взвешивали приблизительно 50 мг соединения формулы (II) и растворяли в различных растворителях, смеси перемешивали при 50°C в течение 3 ч. Реакционные жидкости охлаждали до комнатной температуры, фильтровали для сбора и сушили в вакууме, и полученные твердые вещества тестировали с помощью ПРД (XRPD). Результаты тестов продемонстрированы в Таблице 10 ниже:

**Таблица 10: Результаты тестирования стабильности соединения формулы (II) в различных растворителях**

№	Растворитель	Внешний вид	Кристаллическая форма
1	Метанол	Суспензия	Кристаллическая форма А
2	Ацетонитрил	Суспензия	Кристаллическая форма А
3	<i>трет</i> -Бутилметилловый эфир	Суспензия	Кристаллическая форма А
4	Этанол	Суспензия	Кристаллическая форма В
5	<i>n</i> -Гептан	Суспензия	Кристаллическая форма В

**Заключение:** Соединение формулы (II) образует кристаллическую форму А в

метаноле, ацетонитриле и *трет*-бутилметилом эфире и образует кристаллическую форму В в этаноле и *n*-гептане, где результаты обнаружения ПРД (XRPD) и ДСК (DSC) кристаллической формы В последовательно продемонстрированы на ФИГ. 4 и ФИГ. 5.

**Пример 5: Исследование гигроскопичности кристаллической формы А соединения формулы (II)**

Материалы:

Прибор для динамической сорбции паров SMS DVS intrinsic

Процедуры:

Кристаллическую форму А соединения формулы (II) (10-15 мг) помещали в лоток для образцов ДСП (DVS) для тестирования.

Результаты:

Профиль ДСП (DVS) кристаллической формы А соединения формулы (II) продемонстрирован на ФИГ. 6,  $\Delta W=1,179\%$ .

Закключение:

Кристаллическая форма А соединения формулы (II) обладала гигроскопическим увеличением массы 1,179% при 25°C и ОВ (RH) 80%, обладала относительно слабой гигроскопичностью и не изменялась до и после тестирования гигроскопичности таким образом, что кристаллическая форма А представляла собой стабильную кристаллическую форму.

**Экспериментальный пример 6: Тестирование стабильности в твердом состоянии кристаллической формы А соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения**

Кристаллическую форму А соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения подвергали тестированию стабильности с ускоренным подъемом и исследованию стабильности с длительным подъемом в соответствии с правилами и требованиями в “Guidelines for the Stability Test of APIs and Preparations” (General Principles 9001 of the Four Parts of the Chinese Pharmacopoeia, 2020 Edition), “Technical Guidelines for Stability Research of Chemical Drugs (APIs and Preparations) (Revised)”, изданными Центром оценки лекарственных средств Национального управления по медицинским продуктам, и ICH Q1B.

**1. Тестирование стабильности с длительным и с ускоренным подъемом:**

Каждый образец отдельно помещали в двухслойный пакет из полиэтилена низкой

плотности ПЭНП (LDPE), причем каждый слой пакета из ПЭНП (LDPE) был закрыт застегиваемой пряжкой. Затем пакет помещали в пакет из алюминиевой фольги для термоизоляции, а затем помещали в контейнер для обеспечения стабильности в соответствующих для наблюдения условиях. Результаты тестирования стабильности в твердом состоянии кристаллической формы А соединения продемонстрированы в Таблице 11.

**Таблица 11: Результаты тестирования стабильности в твердом состоянии кристаллической формы А соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения**

Условия тестирования	Момент времени	Кристаллическая форма
25°C/60% ОВ (RH)	День 0	Кристаллическая форма А
	12 месяцев	Кристаллическая форма А
40°C/75% ОВ (RH)	День 0	Кристаллическая форма А
	6 месяцев	Кристаллическая форма А

Заключение: кристаллическая форма А соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения обладает хорошей стабильностью в условиях тестирования стабильности с длительным и ускоренным подъемом, и кристаллическая форма А представляет собой стабильную кристаллическую форму.

#### **Анализ биологической активности**

#### **Пример анализа 1: Оценка *in vitro* ингибирующей активности соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения в отношении протеинкиназы MNK2**

Цель эксперимента: тестировать ингибирующую активность соединения в отношении протеинкиназы MNK2

Экспериментальные материалы: буфер для анализа: 8 мМ 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота, 0,2 мМ динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,01% полиоксиэтиленлауриловый эфир, 5%

глицерин, 0,1%  $\beta$ -меркаптоэтанол и 1 мг бычьего сывороточного альбумина.

Ход эксперимента: анализы ингибирующей активности в отношении протеинкиназы Mnk2 проводили с применением системы KinaseProfiler™ от Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited. Серийно разведенные растворы ДМСО (DMSO), содержащие тестируемое соединение (3-кратное серийное разведение, начиная с 10 мкМ), протеинкиназу MNK2 (ч) и 0,33 мг/мл основного белка миелина добавляли к свежеприготовленному буферу (pH=7,0), а затем перемешивали до однородного состояния. Реакцию инициировали путем добавления смеси <sup>33</sup>P-аденозинтрифосфата (<sup>33</sup>P-АТФ (<sup>33</sup>P-АТР)) (интенсивность радиоактивности: 10 мкКи/мкл) и 10 мМ ацетата магния. После того, как полученную в результате смесь подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 40 мин, реакцию останавливали путем добавления фосфорной кислоты для разбавления до концентрации 0,5%. 10 мкл реакционной жидкости фильтровали с использованием P30 filtermat, а затем filtermat четыре раза промывали 0,425% фосфорной кислотой по 4 минуты каждый раз с последующим однократным промыванием метанолом. После сушки интенсивность радиоактивности определяли с использованием способа связывания на фильтре.

Ингибирующую активность соединения в отношении протеинкиназы выражали в виде процентной доли остаточной активности протеинкиназы по сравнению с субстратом в контрольном образце (только ДМСО (DMSO)). Для расчета величины и кривой средней ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) использовали пакет программного обеспечения Prism4 (GraphPad) Конкретная информация продемонстрирована в Таблице 12 ниже.

**Таблица 12: Ингибирующая активность (IC<sub>50</sub>) соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения в отношении протеинкиназы MNK2**

<b>№ соединения</b>	<b>IC<sub>50</sub> (нМ) в отношении MNK2</b>
Соединение формулы (I)	17

Заключение в результате эксперимента: соединение формулы (I) в соответствии с настоящим раскрытием изобретения демонстрирует превосходную ингибирующую активность в отношении протеинкиназы MNK2.

**Пример анализа 2: Оценка *in vitro* ингибирующей активности соединения в**

## **соответствии с настоящим раскрытием изобретения в отношении фосфорилирования eIF4E**

Цель эксперимента: тестировать ингибирование ( $IC_{50}$ ) соединением в отношении фосфорилирования eIF4E для штамма клеток HCT116.

Экспериментальные материалы: клетки HCT116 (Американская коллекция типовых культур (ATCC)), среда RPMI 1640 (Life Technology), фетальная бычья сыворотка (Hyclone), двойные антитела (пенициллин, стрептомицин) (Millipore), фосфатный буфер (Corning), 384-луночный планшет для клеток (PerkinElmer) и набор для анализа AlphaLISA<sup>®</sup> SureFire<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> p-eIF4E (Ser209) (PerkinElmer).

Ход эксперимента: клетки HCT116 разрушали для получения клеточной суспензии, которую затем высевали в 96-луночный планшет. Затем планшет для клеток помещали в инкубатор для инкубирования в течение ночи. Соединение разбавляли до соответствующей концентрации и добавляли в планшет для клеток, и полученную в результате смесь инкубировали в течение 3 ч. Затем клетки лизировали с использованием лизирующего буфера, и лизат переносили в 384-луночный планшет. Готовили свежий смешанный рецептор в соответствии с указаниями к набору и добавляли в 384-луночный планшет, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем готовили свежий смешанный донор в соответствии с указаниями к набору и добавляли в 384-луночный планшет, и полученную в результате смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Сигнал считывали с использованием EnVision с применением стандартной программы AlphaLISA, кривую подгоняли с использованием GraphPad Prism, и рассчитывали величину  $IC_{50}$ . Конкретная информация продемонстрирована в Таблице 13 ниже.

**Таблица 13: Ингибирующая активность ( $IC_{50}$ ) соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения в отношении фосфорилирования eIF4E**

<b>№ соединения</b>	<b><math>IC_{50}</math> (нМ) в отношении штамма клеток HCT116 p-eIF4E</b>
Соединение формулы (I)	8,6

Заключение в результате эксперимента: соединение формулы (I) в соответствии с настоящим раскрытием изобретения демонстрирует превосходную ингибирующую

активность в отношении фосфорилирования eIF4E.

**Пример анализа 3: Эксперимент по оценке эффективности *in vivo* соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения в отношении опухоли трансплантата СТ-26 у мышей**

Цель эксперимента: определить эффективность *in vivo* соединения в отношении опухоли СТ-26, трансплантированной мышам

Экспериментальные материалы: клетки СТ-26, среда RPMI-1640, содержащая 10% фетальной бычьей сыворотки, и мыши (самки, Shanghai Sippe-Bk Lab Animal Co., Ltd.)

Ход эксперимента: клетки СТ-26 культивировали в среде RPMI-1640, содержавшей 10% фетальную бычью сыворотку, в инкубаторе при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Опухолевые клетки субкультивировали, и после того, как была достигнута подходящая концентрация, и опухолевые клетки находились в фазе логарифмического роста, их собирали, подсчитывали, а затем ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (ФСБД (DPBS)) (фосфатном буфере), и концентрацию клеточной суспензии доводили до 3×10<sup>6</sup>/мл для инокуляции.

Получение трансплантированной мышам опухоли, представляющей собой рак толстой кишки: клетки собирали, и их концентрацию доводили до 3×10<sup>6</sup> клеток/мл (ресуспендировали в ФСБД (DPBS) с получением клеточной суспензии), и 0,1 мл опухолевых клеток вводили путем подкожной инъекции в правую верхнюю часть спины мышей в стерильных условиях, и каждой мыши инокулировали 3×10<sup>5</sup> клеток. После того как опухоль вырастала до определенного размера, измеряли длину (а) и ширину (б) указанной опухоли с помощью цифрового штангенциркуля, и рассчитывали объем опухоли (TV), при этом формула расчета выглядит следующим образом:  $TV = a \times b^2 / 2$ .

Инокуляция опухолевых клеток СТ-26: в день инокуляции животных разделяли на группы (по 8 животных в каждой) в соответствии с массой тела и по отдельности подвергали введению лекарственного средства, и день инокуляции рассматривали как D0. Когда размер опухоли достигал приблизительно 60 мм<sup>3</sup>, животных из групп, которым вводили антитела, разделяли на группы в соответствии с размером опухоли и массой тела. Массу тела и размер опухоли у животных измеряли в ходе эксперимента три раза в неделю, тогда как клинические симптомы животных наблюдали и регистрировали ежедневно, и для каждого введения приводили ссылку на массу тела животного, измеренную последней.



Ингибирующее действие соединения в отношении трансплантированной мышам опухоли, представляющей собой рак толстой кишки, определяли после 21-дневного введения в дозе 30 мг/кг 1 раз/день (ОД (QD)) (один раз в день), 90 мг/кг ОД (QD) (один раз в день) и 200 мг/кг ОД (QD) (один раз в день). Конкретная информация продемонстрирована в Таблице 14 ниже.

Индексом оценки противоопухолевой активности является относительная скорость опухолевой пролиферации Т/С (%); если Т/С (%)>40%, то это свидетельствует о неэффективности лекарственного средства, а если Т/С (%) ≤ 40% и P<0,05 после статистической обработки, тогда лекарственное средство считается эффективным. Формула расчета Т/С (%) выглядит следующим образом:  $T/C (\%) = (T_{RTV}/C_{RTV}) \times 100\%$ .  $T_{RTV}$  представляет собой относительный объем опухоли в группе, подвергнутой обработке, и  $C_{RTV}$  представляет собой относительный объем опухоли в группе отрицательного контроля;  $TGI (\%)^a = (1 - \text{средний объем опухоли в конце введения в группе, подвергнутой обработке} / \text{средний объем опухоли в конце обработки в контрольной группе, которой вводили растворитель}) \times 100\%$ .

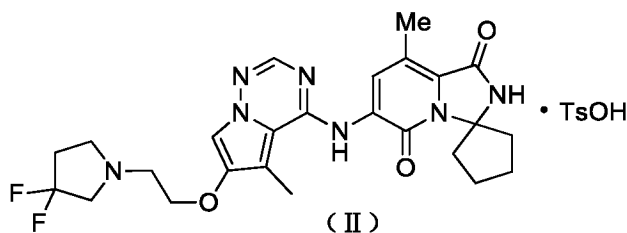
**Таблица 14: Противоопухолевая эффективность соединения в соответствии с настоящим раскрытием изобретения *in vivo* в модели опухоли трансплантата СТ-26**

Соединение	Вводимая доза	TGI%	T/C%
Соединение формулы (I)	30 мг/кг, ОД	63,57	36,43
Соединение формулы (I)	90 мг/кг, ОД	68,89	31,11
Соединение формулы (I)	200 мг/кг, ОД	68,51	33,31

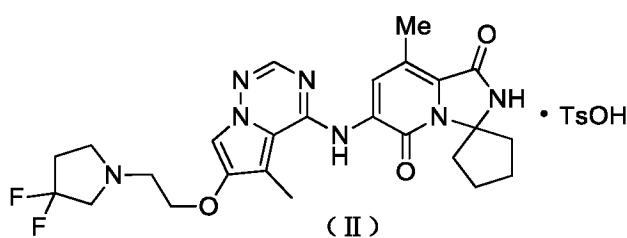
Вывод на основании эксперимента: соединение формулы (I) в соответствии с настоящим раскрытием изобретения оказывает значительный эффект на ингибирование опухоли трансплантата рака толстой кишки у мышей.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (II)



2. Кристаллическая форма А соединения формулы (II), где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$  и  $20,58\pm 0,20^\circ$ ;



3. Кристаллическая форма А по п. 2, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $9,44\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$ ,  $19,84\pm 0,20^\circ$ ,  $20,58\pm 0,20^\circ$ ,  $21,56\pm 0,20^\circ$ ,  $22,86\pm 0,20^\circ$  и  $24,82\pm 0,20^\circ$ .

4. Кристаллическая форма А по п. 3, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $6,58\pm 0,20^\circ$ ,  $7,78\pm 0,20^\circ$ ,  $9,44\pm 0,20^\circ$ ,  $11,38\pm 0,20^\circ$ ,  $14,38\pm 0,20^\circ$ ,  $18,66\pm 0,20^\circ$ ,  $19,84\pm 0,20^\circ$ ,  $20,58\pm 0,20^\circ$ ,  $21,56\pm 0,20^\circ$ ,  $22,86\pm 0,20^\circ$ ,  $23,54\pm 0,20^\circ$  и  $24,82\pm 0,20^\circ$ .

5. Кристаллическая форма А по п. 4, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,78^\circ$ ,  $6,58^\circ$ ,  $7,78^\circ$ ,  $9,44^\circ$ ,  $11,38^\circ$ ,  $13,48^\circ$ ,  $14,38^\circ$ ,  $14,80^\circ$ ,  $16,42^\circ$ ,  $17,00^\circ$ ,  $17,32^\circ$ ,  $18,34^\circ$ ,  $18,66^\circ$ ,  $19,08^\circ$ ,  $19,60^\circ$ ,  $19,84^\circ$ ,  $20,28^\circ$ ,  $20,58^\circ$ ,  $21,56^\circ$ ,  $21,84^\circ$ ,  $22,52^\circ$ ,  $22,86^\circ$ ,  $23,26^\circ$ ,  $23,54^\circ$ ,  $24,46^\circ$ ,  $24,82^\circ$ ,  $25,50^\circ$ ,  $26,04^\circ$ ,  $26,58^\circ$ ,  $27,42^\circ$ ,  $27,82^\circ$ ,  $28,07^\circ$ ,  $28,42^\circ$ ,  $29,08^\circ$ ,  $29,66^\circ$ ,  $30,08^\circ$ ,  $31,20^\circ$ ,  $31,42^\circ$ ,  $38,22^\circ$  и  $39,04^\circ$ .

6. Кристаллическая форма А по п. 5, где дифрактограмма порошковой рентгеновской дифракции кристаллической формы А является по существу такой, как продемонстрировано на ФИГ. 1.

7. Кристаллическая форма А по любому из пп. 2-6, где кривая дифференциальной

сканирующей калориметрии кристаллической формы А имеет эндотермический пик при  $287,17 \pm 3$  °С.

8. Кристаллическая форма А по п. 7, где профиль дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллической формы А продемонстрирован на ФИГ. 2.

9. Кристаллическая форма А по любому из пп. 2-6, где кривая термогравиметрического анализа кристаллической формы А демонстрирует потерю массы  $0,075\%$  при  $200,0 \pm 3$  °С.

10. Кристаллическая форма А по п. 9, где профиль термогравиметрического анализа кристаллической формы А продемонстрирован на ФИГ. 3.

11. Способ получения кристаллической формы А соединения формулы (II), включающий следующие стадии:

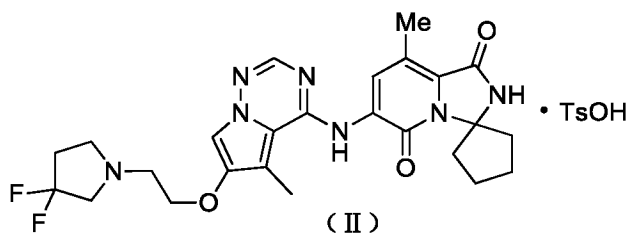
(а) добавление соединения формулы (II) к растворителю с получением суспензии;

(б) перемешивание суспензии при  $40-55$  °С в течение 2-25 ч; и

(в) фильтрование суспензии и последующая сушка осадка на фильтре в вакууме при  $30-45$  °С в течение 10-24 часов;

где растворитель выбран из метанола, ацетонитрила и *трет*-бутилметилового эфира.

12. Кристаллическая форма В соединения формулы (II), где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $7,55 \pm 0,20$ °,  $15,13 \pm 0,20$ ° и  $19,82 \pm 0,20$ °;



13. Кристаллическая форма В по п. 12, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $6,89 \pm 0,20$ °,  $7,55 \pm 0,20$ °,  $9,50 \pm 0,20$ °,  $11,35 \pm 0,20$ °,  $12,72 \pm 0,20$ °,  $15,13 \pm 0,20$ °,  $19,82 \pm 0,20$ ° и  $26,63 \pm 0,20$ °.

14. Кристаллическая форма В по п. 13, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $6,89 \pm 0,20$ °,  $7,55 \pm 0,20$ °,  $9,50 \pm 0,20$ °,  $11,35 \pm 0,20$ °,  $12,24 \pm 0,20$ °,  $12,72 \pm 0,20$ °,  $15,13 \pm 0,20$ °,  $18,94 \pm 0,20$ °,  $19,82 \pm 0,20$ °,  $23,25 \pm 0,20$ °,  $26,63 \pm 0,20$ ° и  $27,27 \pm 0,20$ °.

15. Кристаллическая форма В по п. 14, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В содержит характеристические дифракционные пики при следующих углах  $2\theta$ :  $4,98^\circ$ ,  $6,89^\circ$ ,  $7,55^\circ$ ,  $8,46^\circ$ ,  $9,50^\circ$ ,  $10,12^\circ$ ,  $11,35^\circ$ ,  $12,24^\circ$ ,  $12,72^\circ$ ,  $14,05^\circ$ ,  $15,13^\circ$ ,  $15,65^\circ$ ,  $16,20^\circ$ ,  $17,79^\circ$ ,  $18,94^\circ$ ,  $19,82^\circ$ ,  $20,76^\circ$ ,  $21,61^\circ$ ,  $23,25^\circ$ ,  $23,87^\circ$ ,  $26,09^\circ$ ,  $26,63^\circ$ ,  $27,27^\circ$ ,  $28,45^\circ$ ,  $29,12^\circ$ ,  $30,95^\circ$ ,  $32,32^\circ$ ,  $34,62^\circ$  и  $38,41^\circ$ .

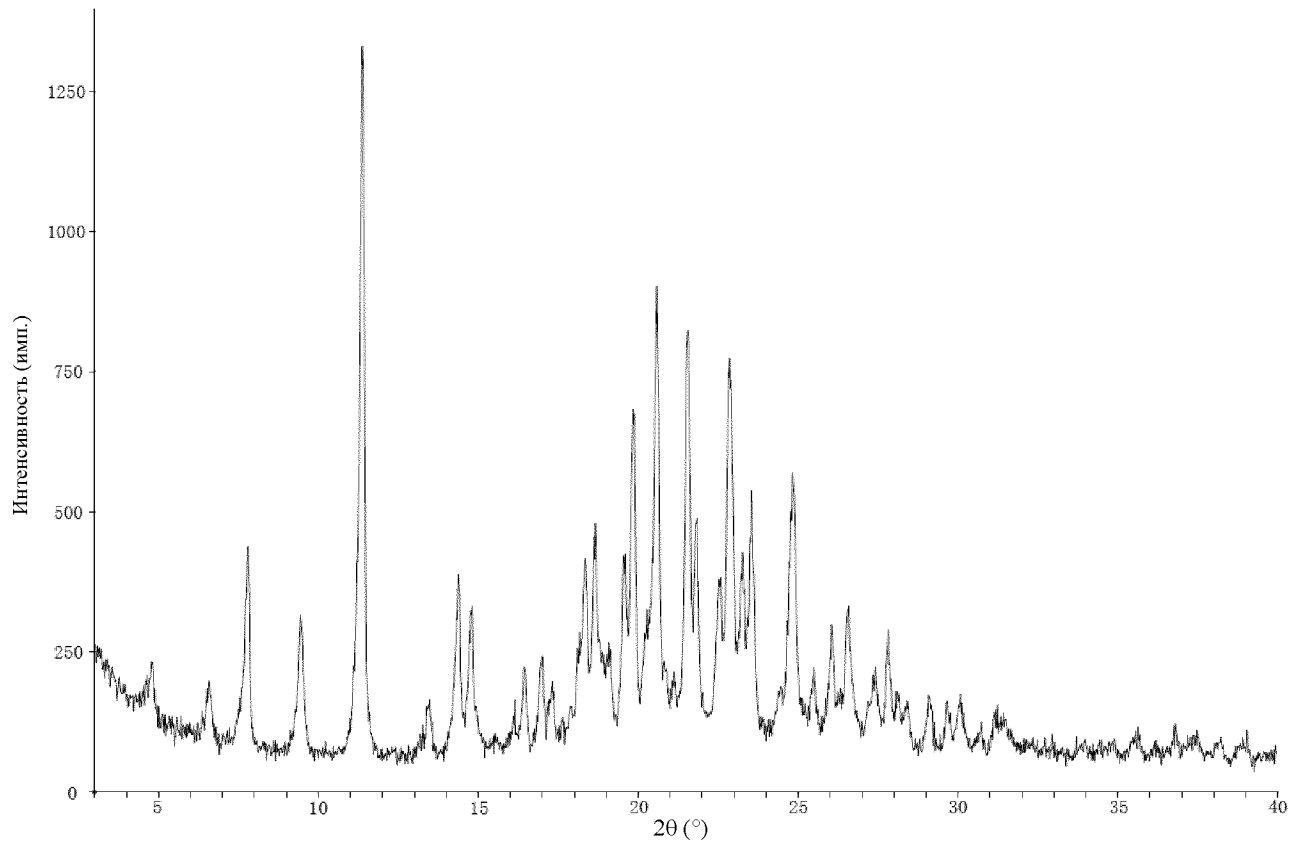
16. Кристаллическая форма В по п. 15, где порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы В по существу является такой, как продемонстрировано на ФИГ. 4.

17. Кристаллическая форма В по любому из пп. 12-16, где кривая дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллической формы В имеет эндотермический пик при  $300,0 \pm 3^\circ\text{C}$ .

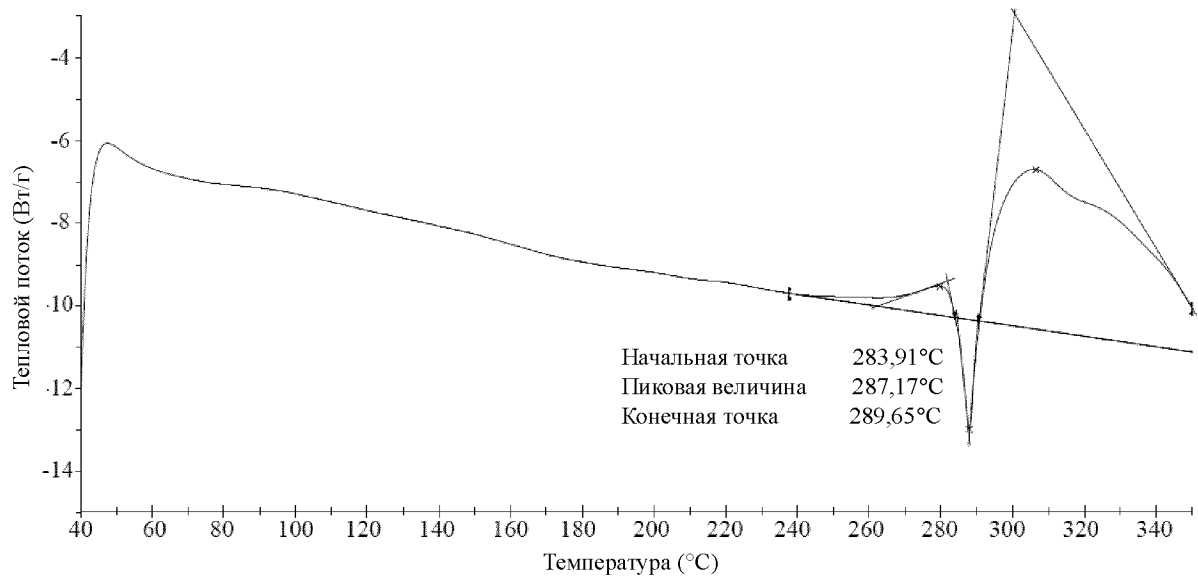
18. Кристаллическая форма В по п. 17, где профиль дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллической формы В продемонстрирован на ФИГ. 5.

19. Применение соединения формулы (II) по п. 1, кристаллической формы А по любому из пп. 2-10, кристаллической формы В по любому из пп. 12-18 и кристаллических форм, полученных при помощи способа по п. 11, для приготовления лекарственного средства-ингибитора MNK1/2.

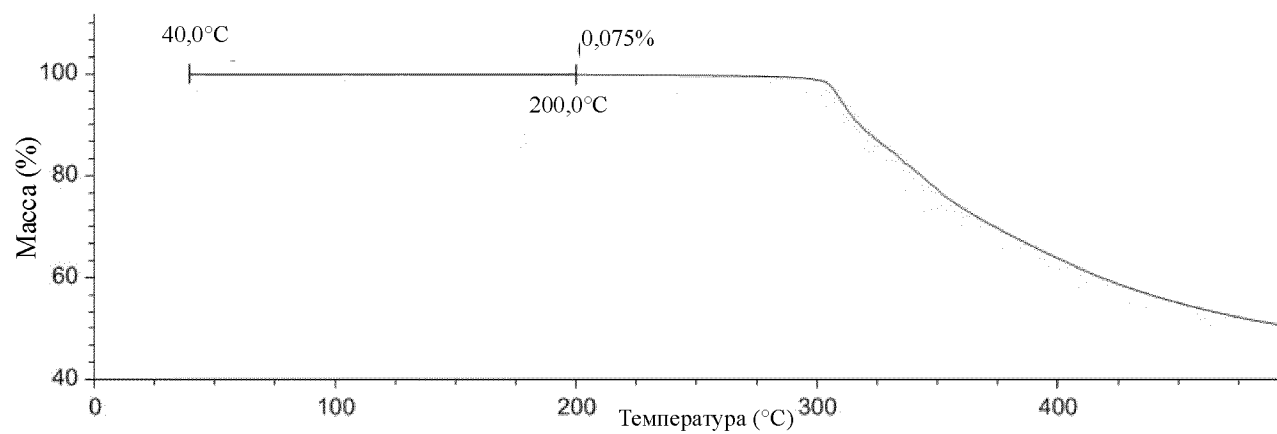
20. Применение соединения формулы (II) по п. 1, кристаллической формы А по любому из пп. 2-10, кристаллической формы В по любому из пп. 12-18 и кристаллических форм, полученных при помощи способа по п. 11, для приготовления лекарственного средства для лечения колоректального рака.



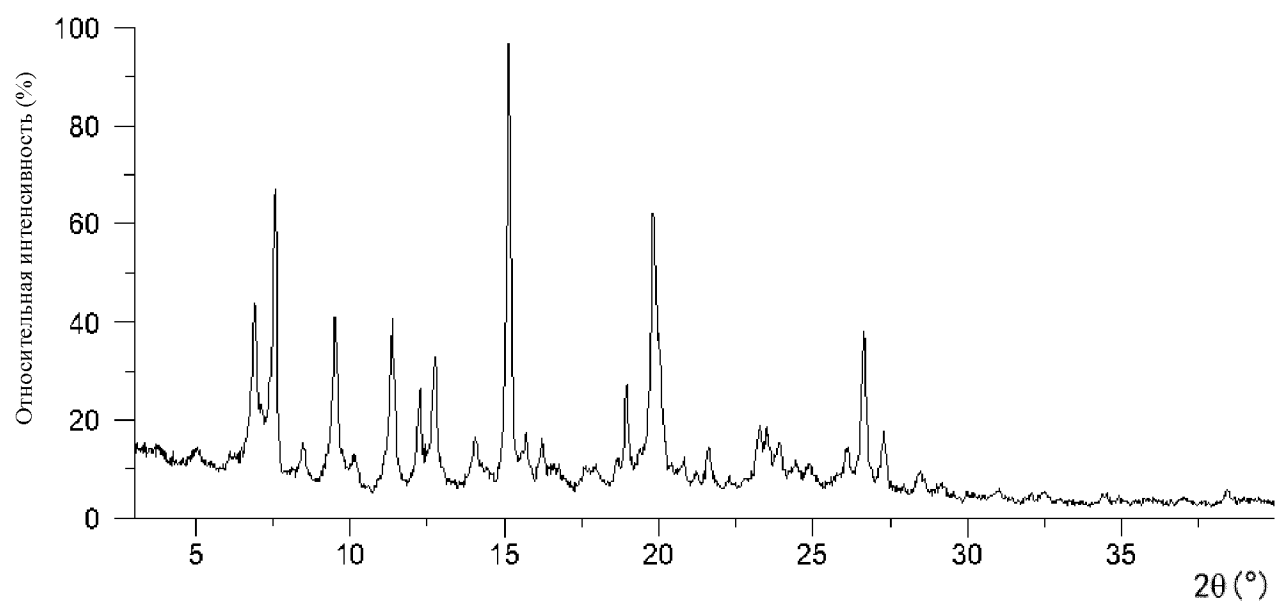
ФИГ. 1



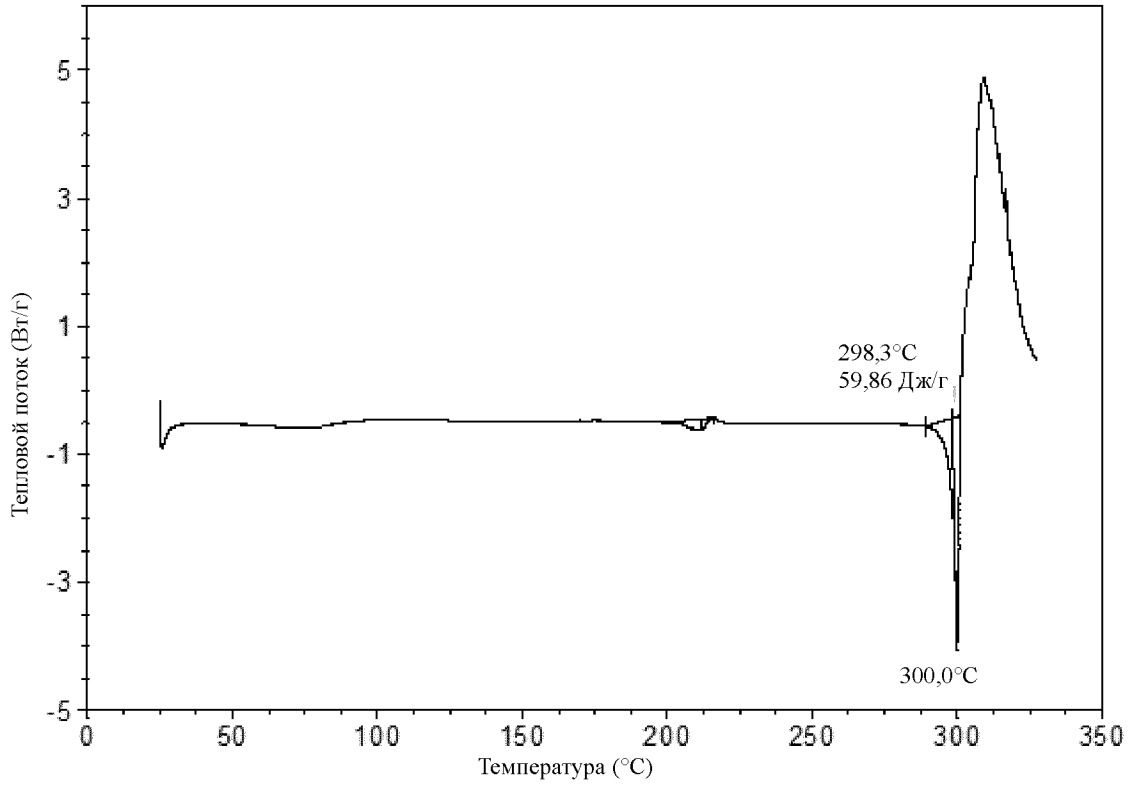
ФИГ. 2



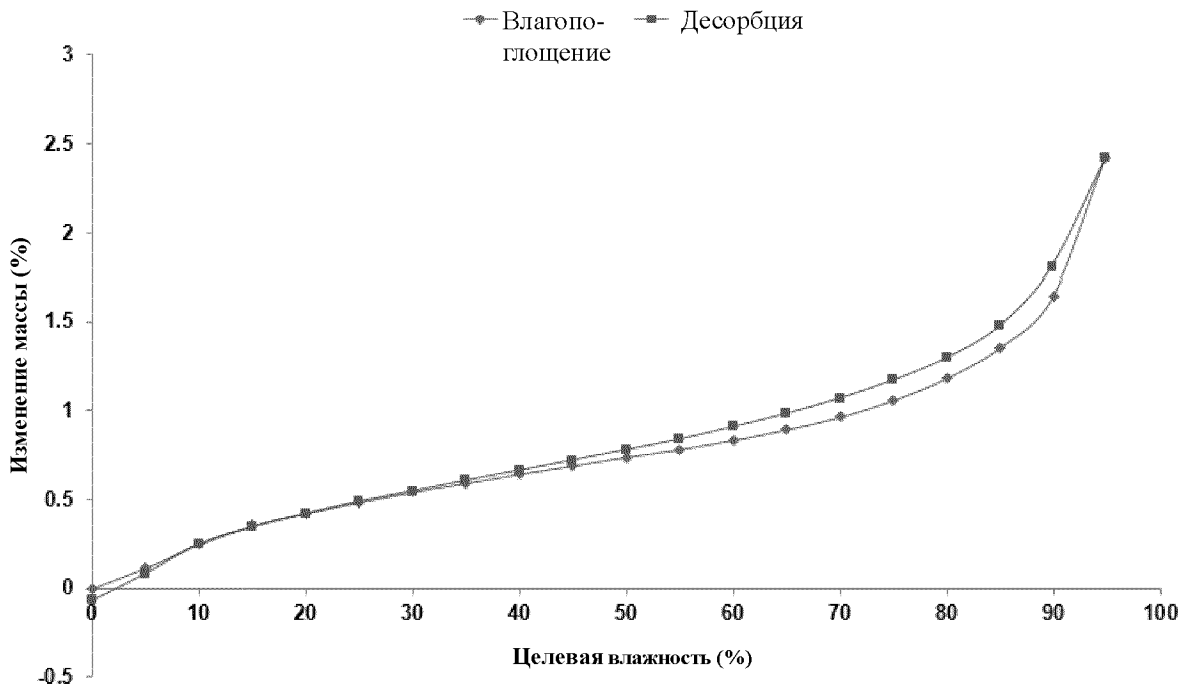
ФИГ. 3



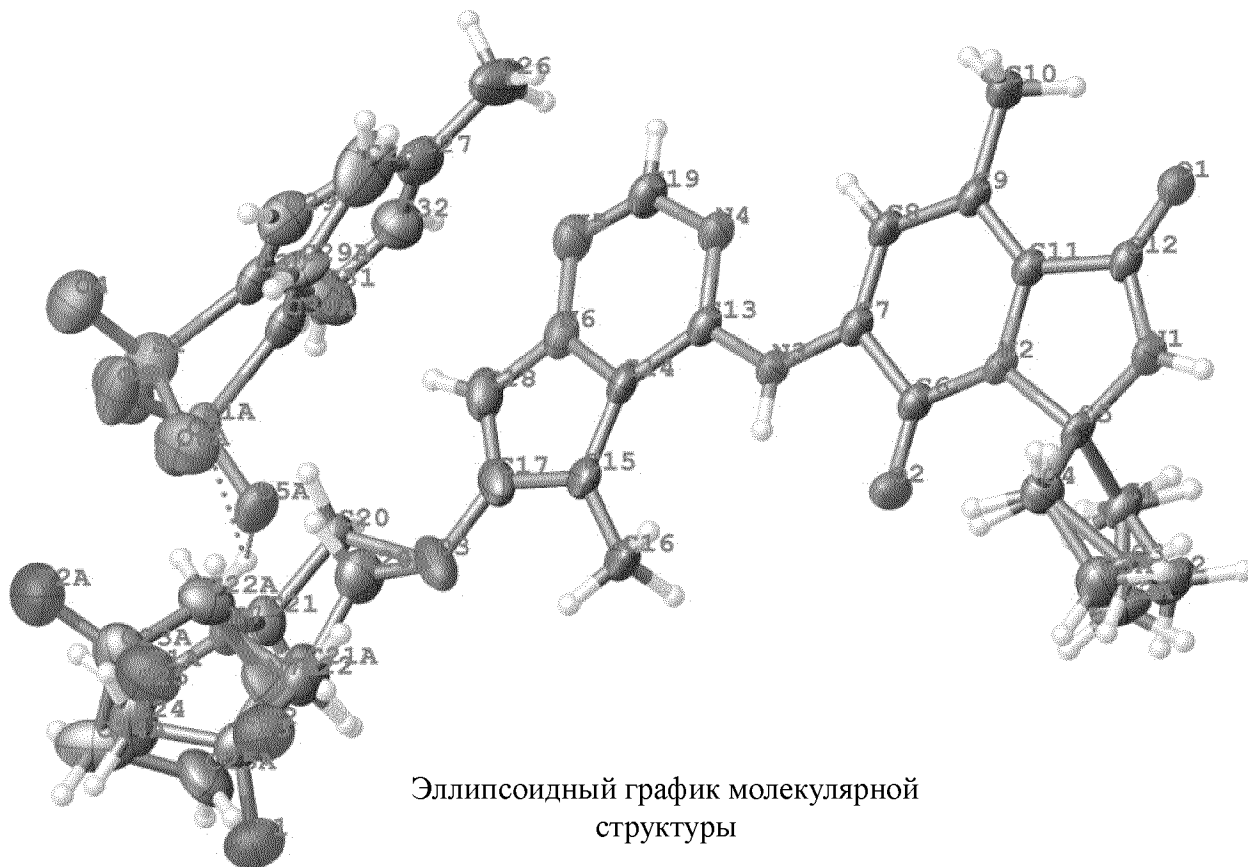
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



Эллипсоидный график молекулярной  
структуры

**ФИГ. 7**