

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393513 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.07

(51) Int. Cl. C07D 513/04 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/429 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.06.24

(54) ДИМЕТИЛ-ЗАМЕЩЕННОЕ ТИАЗОЛОЛАКТАМНОЕ СОЕДИНЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110723288.5; 202111669920.9;  
202210693547.9

(72) Изобретатель:  
Ли И, Юй Тао, Лю Нин, У Чэндэ,  
Чень Шухуэй (CN)

(32) 2021.06.28; 2021.12.31; 2022.06.17

(33) CN

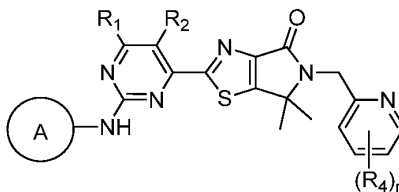
(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(86) PCT/CN2022/101283

(87) WO 2023/274088 2023.01.05

(71) Заявитель:  
ДЗ БАЙО (УСИ) КО., ЛТД. (CN)

(57) Описано диметил-замещенное тиазололактамное соединение и его применение в получении лекарственного средства для лечения соответствующих заболеваний. Конкретнее, описано соединение формулы (I) и его фармацевтически приемлемая соль.



A1

202393513

202393513

A1

## ДИМЕТИЛ-ЗАМЕЩЕННОЕ ТИАЗОЛОЛАКТАМНОЕ СОЕДИНЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

**В настоящей заявке испрашивается приоритет, заявленный в заявках:**

CN202110723288.5, подана 28 июня 2021г.;

CN202111669920.9, подана 31 декабря 2021г.;

CN202210693547.9, подана 17 июня 2022г.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение касается класса диметил-замещенных тиазололактамных соединений и их применения в производстве лекарственного средства для лечения соответствующих заболеваний. Конкретнее, настоящее изобретение касается соединения формулы (I) и его фармацевтически приемлемой соли.

### **Предшествующий уровень техники**

Сигнальный путь Ras/Raf/MEK/ERK представляет собой классический митоген-активированный протеинкиназный (МАРК) сигнальный каскад, он задействован в передаче сигнала различных факторов роста, цитокинов, митогенов и рецепторов гормонов после активации, и является одним из наиболее важных сигнальных путей для контроля роста, дифференциации и выживания клеток.

Исследования показали, что аномальная активация Ras/Raf/MEK/ERK пути, вызванная мутацией или амплификацией, является определяющим фактором для различных видов рака. При опухолях человека встречаемость RAS мутации составляет около 22%, встречаемость BRAF мутации составляет около 7%, и встречаемость MEK мутации составляет около 1%. Поэтому белки в ключевых узлах этого пути стали важными мишенями для лечения раковых заболеваний (*Cancer Discov.* **2019**, *9*, 329-341). В настоящее время ряд BRAF ингибиторов и MEK1/2 ингибиторов, а также их комбинированное применение были одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (US FDA) для лечения меланомы, BRAFV600E мутантного немелкоклеточного рака легких и других видов рака. Однако применение BRAF и MEK ингибиторов в отношении этих вышележащих узлов может быстро приводить к проблеме лекарственной устойчивости вследствие мутации или восстановления активности пути, что серьезно ограничивает их клиническое применение.

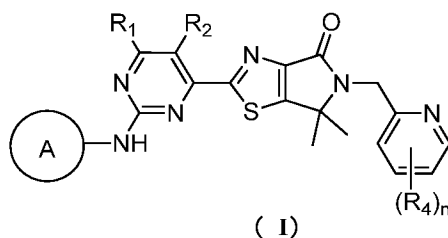
Внеклеточно регулируемые протеинкиназы (ERK) (в особенности ERK1 и ERK2 киназы) являются ключевыми участниками и нижележащими ключевыми узлами в Ras/Raf/MEK/ERK пути, и их сверхактивация наблюдается при многих видах рака

человека. У ERK, являющейся терминальной сигнальной киназой в этом пути, до настоящего времени не обнаружены мутации, которые приводят к лекарственной устойчивости. Поэтому можно ожидать, что лекарство, воздействующее на ERK киназу, позволит преодолеть проблему лекарственной устойчивости, вызванную лечением ингибиторами вышележащих мишеней, и станет более результативной терапевтической стратегией. Но к настоящему моменту разработка ERK ингибиторов все еще находится на стадии клинических испытаний, и ни одного ERK ингибитора не было одобрено для выпуска на рынок в качестве лекарственного средства.

Кратко суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что для удовлетворения потребностей лечения раковых опухолей срочно необходима разработка безопасного и эффективного лекарственного средства, являющегося ERK ингибитором.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении описано соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



где

$R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_a$ ;

каждый  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_c$ ;

$n$  выбран из 1 и 2;

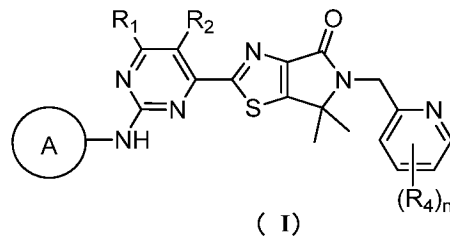
кольцо A выбрано из пиразолила и тетрагидропиранила, где пиразолил и тетрагидропиранил необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя  $R_d$ ;

$R_a$  и  $R_c$  каждый независимо выбраны из D, F, Cl, Br и I;

$R_d$  выбран из F, Cl, Br, I,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси, где  $C_{1-3}$  алкил и  $C_{1-3}$  алкокси необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R;

R выбран из F, Cl, Br и I.

В настоящем изобретении описано соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



где

$R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_a$ ;

каждый  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_c$ ;

$n$  выбран из 1 и 2;

кольцо A выбрано из пиразолила и тетрагидропиранила, где пиразолил и тетрагидропиранил обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя  $R_d$ ;

$R_a$  и  $R_c$  каждый независимо выбраны из D, F, Cl, Br и I;

$R_d$  выбран из F, Cl, Br, I,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси, где  $C_{1-3}$  алкил и  $C_{1-3}$  алкокси обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R;

R выбран из F, Cl и Br.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше  $R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H,  $CH_3$  и  $CH_2CH_3$ , где  $CH_3$  и  $CH_2CH_3$  обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя  $R_a$ , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше  $R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H,  $CH_3$ ,  $CHF_2$ ,  $CD_3$  и  $CH_2CH_3$ , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $CH_3$ , где  $CH_3$  обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_c$ , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

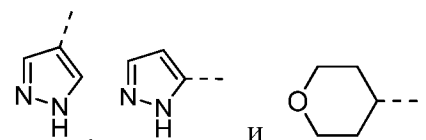
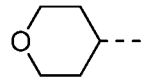
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутый выше  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $CH_3$ , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутый выше  $R_d$  выбран из F, Cl, Br, I,  $CH_3$  и  $OCH_3$ , где  $CH_3$  и  $OCH_3$  обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R, и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

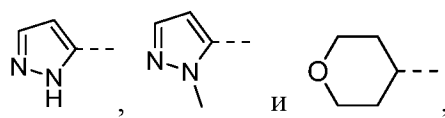
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутый выше  $R_d$  выбран из  $CH_3$  и  $OCH_3$ , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

значения.

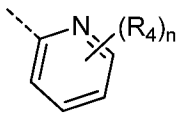
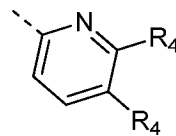
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутое выше

кольцо А выбрано из , где  и  обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R<sub>4</sub>, и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

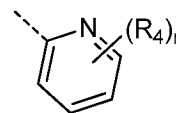
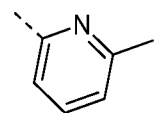
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутое выше

кольцо А выбрано из , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутый выше

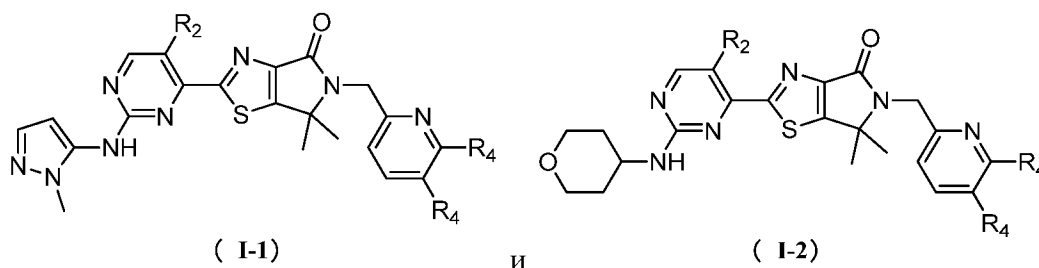
структурный фрагмент  выбран из , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутый выше

структурный фрагмент  выбран из , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

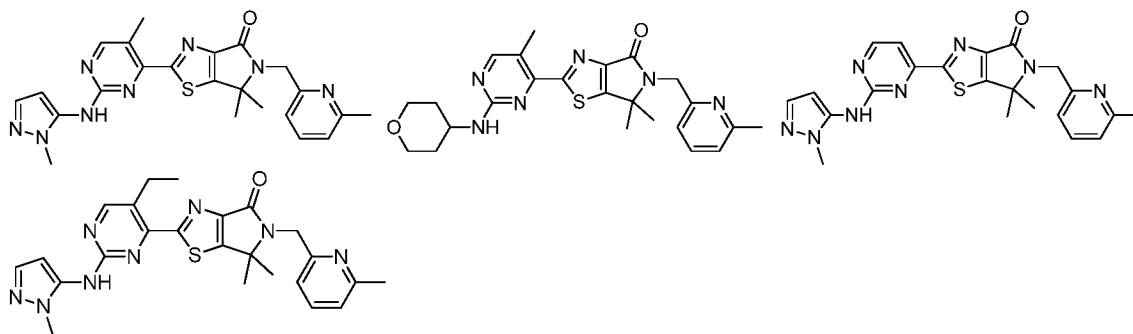
Настоящее изобретение включает также варианты осуществления, полученные любой комбинацией описанных выше переменных.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описано упомянутое выше соединение или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из:



где R<sub>2</sub> и R<sub>4</sub> имеют указанные в настоящем тексте значения.

В настоящем изобретении описано также соединение, имеющее приведенную ниже формулу, или его фармацевтически приемлемая соль



В настоящем изобретении описано также применение описанного выше соединения или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения солидных опухолей.

### **Технический эффект**

Соединения по настоящему изобретению демонстрируют высокую ингибирующую активность в отношении ферментов ERK1 и ERK2; соединения по настоящему изобретению демонстрируют высокую ингибирующую активность в отношении пролиферации клеток HT29; соединения по настоящему изобретению имеют хорошую растворимость при разных значениях pH; соединения по настоящему изобретению имеют прекрасные фармакокинетические характеристики и ингибирующее действие в отношении опухолей; соединения по настоящему изобретению оказывают слабое ингибирующее действие на ток в hERG калиевых каналах, имеют низкий риск кардиотоксичности и в высокой степени безопасны, и соединения по настоящему изобретению демонстрируют силу связывания с белками крови от умеренной до высокой.

### **Определения**

Если не указано иное, перечисленные ниже термины и обороты имеют указанные далее значения. В отсутствие специального определения, термин или оборот не считается неопределенным или неясным, а должен пониматься в его общеизвестном значении. При использовании торгового наименования имеется в виду его активный ингредиент.

Термин "фармацевтически приемлемый" в настоящем тексте используется в отношении тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые подходят для применения в контакте с тканями животных или человека в рамках квалифицированного медицинского суждения, не вызывая нежелательной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, обладая при этом приемлемым соотношением польза/риск.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль соединения по настоящему изобретению, полученную путем реакции соединения, имеющего определенный раскрытый в настоящем тексте заместитель, с относительно нетоксичной кислотой или основанием. Когда соединения по настоящему изобретению содержат

относительно кислую функциональную группу, можно получить соль с основанием путем контакта соединения с достаточным количеством основания в чистом виде или в подходящем инертном растворителе. Когда соединения по настоящему изобретению содержат относительно основную функциональную группу, можно получить соль с кислотой путем контакта соединения с достаточным количеством кислоты в чистом виде или в подходящем инертном растворителе. Некоторые частные соединения по настоящему изобретению содержат и основную, и кислотную функциональные группы, и могут быть превращены в любую соль с основанием или кислотой.

Фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению можно получить из материнского соединения, которое содержит кислотный или основной фрагмент, общеизвестными химическими методами. В целом, такую соль можно получить реакцией соединения в форме свободной кислоты или свободного основания со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или органическом растворителе, или в их смеси.

Если не указано иное, термин "изомер" включает геометрические изомеры, цис- или транс-изомеры, стереоизомеры, энантиомеры, оптические изомеры, диастереомеры и таутомеры.











Соединения по настоящему изобретению могут присутствовать в определенной геометрической или стереоизомерной форме. Настоящая заявка охватывает все такие соединения, включая цис и транс изомеры, (-) и (+)-энантиомеры, (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереомер, (*D*)-изомер, (*L*)-изомер, а также рацемическую смесь и другие смеси, например, смесь, обогащенную энантиомером или диастереомером, и все они входят в заявленный объем притязаний настоящего изобретения. Заместитель, такой как алкил, может содержать дополнительный асимметрический атом углерода. Все эти изомеры и их смеси охватываются настоящим изобретением.

Если не указано иное, термин "энантиомер" или "оптический изомер" означает стереоизомеры, которые являются зеркальными отражениями друг друга.

Если не указано иное, термин "цис-транс-изомеры" или "геометрические изомеры" возникают вследствие неспособности двойной связи или простой связи между образующими кольцо атомами к свободному вращению.

Если не указано иное, термин "диастереомер" означает стереоизомеры, в молекуле которых содержатся два или больше хиральных центров и которые не являются зеркальным отображением друг друга.

Если не указано иное, "(+)" означает декстроизомер, "(-)" означает левоизомер, и "(±)" означает рацемат.

Если не указано иное, клиновидная сплошная связь () и клиновидная пунктирная связь () означают абсолютную конфигурацию стереоцентра; линейная сплошная связь () и линейная пунктирная связь () означают относительную конфигурацию стереоцентра; волнистая линия () означает клиновидную сплошную связь () или клиновидную пунктирную связь (); или волнистая линия () означает линейную сплошную связь () и линейную пунктирную связь ().

Если не указано иное, термины "таутомер" или "таутомерная форма" означают, что разные функциональные группы в изомерах находятся в динамическом равновесии и могут быстро превращаться друг в друга при комнатной температуре. Если возможно наличие таутомеров (например, в растворе), может достигаться химическое равновесие таутомеров. Например, прототропные таутомеры включают взаимопревращение посредством перескока протона, такое как кето-енольная изомеризация и имин-енаминовая изомеризация. Валентные таутомеры включают взаимопревращение посредством перекомбинации некоторых связывающих электронов. Частным примером кето-енольной таутомерии является взаимопревращение между двумя таутомерами: пентан-2,4-дионом и 4-гидроксипент-3-ен-2-оном.

Если не указано иное, термин "обогащенный одним изомером", "изомерно обогащенный", "обогащенный одним энантиомером" или "энантиомерно обогащенный" означает, что содержание одного изомера или энантиомера составляет менее 100%, и содержание данного изомера или энантиомера составляет 60% или больше, или 70% или больше, или 80% или больше, или 90% или больше, или 95% или больше, или 96% или больше, или 97% или больше, или 98% или больше, или 99% или больше, или 99.5% или больше, или 99.6% или больше, или 99.7% или больше, или 99.8% или больше, или 99.9% или больше.

Если не указано иное, термин "изомерный избыток" или "энантиомерный избыток" означает разницу между относительным процентным содержанием двух изомеров или двух энантиомеров. Например, если один изомер или энантиомер присутствует в количестве 90%, а второй изомер или энантиомер присутствует в количестве 10%, то изомерный или энантиомерный избыток (значение ee) составляет 80%.

Оптически активный (*R*)- и (*S*)-изомер, или *D* и *L* изомер можно получить с применением хирального синтеза или хиральных реагентов или других общеизвестных методик. Если необходимо получить один энантиомер определенного соединения по настоящему изобретению, то целевой чистый энантиомер можно получить асимметрическим синтезом или получением производных с хиральным вспомогательным реагентом, с последующим разделением полученной смеси диастереомеров и



отщеплением вспомогательной группы. Альтернативно, когда молекула содержит основную функциональную группу (такую как аминогруппа) или кислотную функциональную группу (такую как карбоксильная группа), соединение реагирует с подходящей оптически активной кислотой или основанием, образуя соль, являющуюся смесью диастереоизомеров, которую затем расщепляют на два диастереомера известными в данной области методами, получая впоследствии чистый энантиомер. Кроме того, энантиомер и диастереоизомер можно выделить методом хроматографии с применением хиральной неподвижной фазы, при необходимости комбинируя этот метод с методом химической дериватизации (например, получая карбамат из амина).

Соединения по настоящему изобретению могут содержать неприродное соотношение изотопов атомов по одному или больше атомам, составляющим данные соединения. Например, соединение может быть помечено радиоизотопом, таким как тритий ( $^3\text{H}$ ), иод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или С-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Как еще один пример, водород может быть заменен на более тяжелый изотоп водорода, образуя дейтерированное лекарство. Связь между дейтерием и углеродом прочнее, чем между обычным атомом водорода и углеродом. По сравнению с недейтерированным лекарством, дейтерированные лекарства имеют преимущества, заключающиеся в уменьшенных побочных эффектах токсичности, повышенной устойчивости лекарства, повышенной эффективности и увеличенном времени полужизни лекарств. Все изменения изотопного состава в соединениях по настоящему изобретению, вне зависимости от радиоактивности, включены в объем притязаний, заявленный в настоящем изобретении.

Термин "опционально" или "необязательно" означает, что описанное далее событие или условие может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда данное событие или условие происходят, и случаи, когда они не происходят.

Термин "замещенный" означает, что один или больше атомов водорода у определенного атома заменены на заместитель, включая дейтериевые и водородные варианты, при условии, что валентность у данного определенного атома остается нормальной, и замещенное соединение устойчиво. Когда заместителем является оксо-группа (т.е.,  $=\text{O}$ ), это означает что замещены два атома водорода. Положения в ароматическом кольце не могут быть замещены оксо-группой. Термин "необязательно замещенный" означает, что атом может быть замещен на заместитель или нет, если не указано иное, при этом тип и число заместителей может быть любым, при условии, что они химически допустимы.

Когда любая переменная (такая как R) содержится в структуре соединения более одного раза, значение переменной в каждом случае является независимым. Так, например,

если группа замещена 0-2 заместителями R, данная группа может опционально иметь от 0 до 2 заместителей R, где значение R в каждом случае является независимым. Более того, комбинация заместителя и/или его варианта допускается только тогда, когда эта комбинация дает устойчивое соединение.

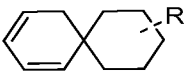
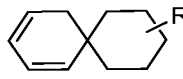
Когда число линкерных групп равно 0, например  $-(CRR)_0-$ , это означает, что линкерная группа представляет собой простую связь.

Когда число заместителей равно 0, это означает что заместителя нет. Например,  $-A-(R)_0$  означает, что структура на самом деле представляет собой  $-A$ .

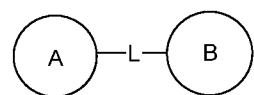
Когда заместитель является вакантным, это означает, что данного заместителя нет. Например, когда X является вакантным в A-X, структура A-X в действительности представляет собой A.

Когда одна из переменных представляет собой простую связь, это означает, что две группы, соединенные простой связью, соединены между собой напрямую. Например, когда L в A-L-Z представляет собой простую связь, структура A-L-Z в действительности представляет собой A-Z.

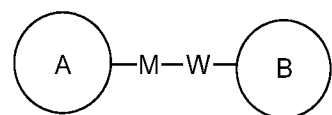
Когда связь с заместителем может осуществляться с двумя или больше атомами кольца, этот заместитель может быть связан с любым из атомов в кольце. Например,

структурный фрагмент  или  означает, что заместитель R в нем может быть заместителем в любом положении циклогексила или циклогексадиена. Когда для пронумерованного заместителя не указано через какой атом он связан с замещенной группой, такой заместитель может быть связан через любой из своих атомов. Например, пиридинильная группа в качестве заместителя может быть связана с замещенной группой через любой из атомов углерода в пиридиновом кольце.

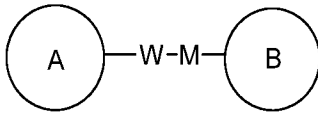
Когда для линкерной группы не указано направление связывания, значит направление связывания является произвольным. Например, когда линкерная группа L в



представляет собой  $-M-W-$ , то фрагмент  $-M-W-$  может быть связан с кольцом A и кольцом B в порядке прочтения слева направо и дает фрагмент



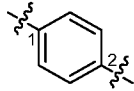
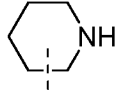
, или этот фрагмент может быть связан с кольцом A и кольцом B в

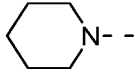
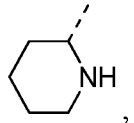
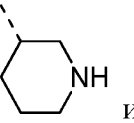
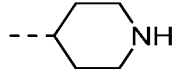
порядке, обратном прочтению слева направо, давая фрагмент .

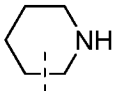
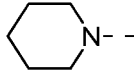
Комбинация линкерных групп, заместителей и/или их вариантов допустима только тогда,

когда такая комбинация приводит к устойчивому соединению.

Если не указано иное, когда группа имеет один или больше сайтов связывания, любые один или больше сайтов в этой группе могут быть соединены с другими группами посредством химических связей. Когда положение присоединения химической связи переменное, и есть атом(ы) Н у сайтов присоединения, то если с химической связью соединен(ы) сайт(ы) связывания, имеющие атом(ы) Н, тогда число атомов Н у этого сайта соответственно уменьшается по мере увеличения числа присоединенных химических связей, и у группы сохраняется нужная валентность. Химическая связь между сайтом и другими группами может быть изображена в виде прямой сплошной линии ( $\diagup$ ), прямой пунктирной линии ( $\cdots$ ) или волнистой линии ( $\sim$ ). Например, прямая сплошная линия в  $-\text{OSN}_3$  показывает, что данная группа соединена с остальными группами через атом кислорода в этой группе; прямая пунктирная линия в  $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$  показывает, что данная группа соединена с остальными группами по двум концам через атом кислорода в этой группе;

волнистая линия в  показывает, что данная группа соединена с остальными группами через атомы углерода 1 и 2 в фенильной группе;  показывает, что любой способный к соединению сайт в пиперидинильной группе может быть соединен с другими группами одной химической связью, включая по меньшей мере четыре способа

связывания:  ,  ,  и  ; даже если атом Н изображен у -

N-, то  тем не менее включает в себя возможность связывания  ; просто когда присоединяется одна химическая связь, число атомов Н у этого сайта уменьшается на один, и группа становится соответствующей одновалентной пиперидинильной группой.

Если не указано иное, число атомов в кольце обычно определяется как число членов кольца, например, "5-7-членное кольцо" означает "кольцо" из 5-7 атомов, расположенных по окружности.

Если не указано иное, термин "C<sub>1-3</sub> алкил" означает линейную или разветвленную насыщенную углеводородную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода. C<sub>1-3</sub> алкильная группа включает C<sub>1-2</sub> алкильную, C<sub>2-3</sub> алкильную группу и т.д. Она может быть одновалентной (например, метил), двухвалентной (например, метилен) или многовалентной (например, метенил). Примеры C<sub>1-3</sub> алкильных групп включают (но не

ограничиваются только ими) метил (Me), этил (Et), пропил (включая н-пропил и изопропил) и т.п.

Если не указано иное, термин "C<sub>1-3</sub> алкокси" означает алкильную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода и присоединенную к остальной части молекулы через атом кислорода. C<sub>1-3</sub> алкокси-группа включает C<sub>1-2</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>3</sub> и C<sub>2</sub> алкокси-группы, и т.п. Примеры C<sub>1-3</sub> алкокси-групп включают (но не ограничиваются только ими) метокси, этокси, пропокси (включая н-пропокси и изопропокси) и т.п.

Соединения по настоящему изобретению можно получить различными методами синтеза, хорошо известными квалифицированным специалистам в данной области, включая перечисленные ниже варианты осуществления, а также варианты осуществления, полученные комбинацией перечисленных ниже вариантов осуществления с другими методами химического синтеза, и эквивалентные замены, хорошо известные квалифицированным специалистам в данной области. Альтернативные варианты осуществления включают (но не ограничиваются только ими) раскрытые в настоящей заявке примеры.

Растворители, используемые по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными.

В настоящем описании используются следующие сокращения: водн. означает водный; экв. означает эквивалент; ДХМ означает дихлорметан; ПЭ означает петролейный эфир; ДМСО означает диметилсульфоксид; EtOAc означает этилацетат; EtOH означает этанол; MeOH означает метанол; Cbz означает бензилоксикарбонил, который является защитной группой для амина; Boc означает трет-бутоксикарбонил, который является защитной группой для амина; r.t. означает комнатную температуру; ТГФ означает тетрагидрофуран; Boc<sub>2</sub>O означает ди-трет-бутил дикарбонат; ТФУК означает трифторуксусную кислоту; DIPEA означает диизопропилэтиламин; iPrOH означает 2-пропанол; т.пл. означает температуру плавления.

Названия соединений сгенерированы согласно общеизвестным в данной области принципам или с применением программы ChemDraw®, а коммерчески доступные соединения имеют названия, используемые их поставщиками.

### **Краткое описание чертежей**

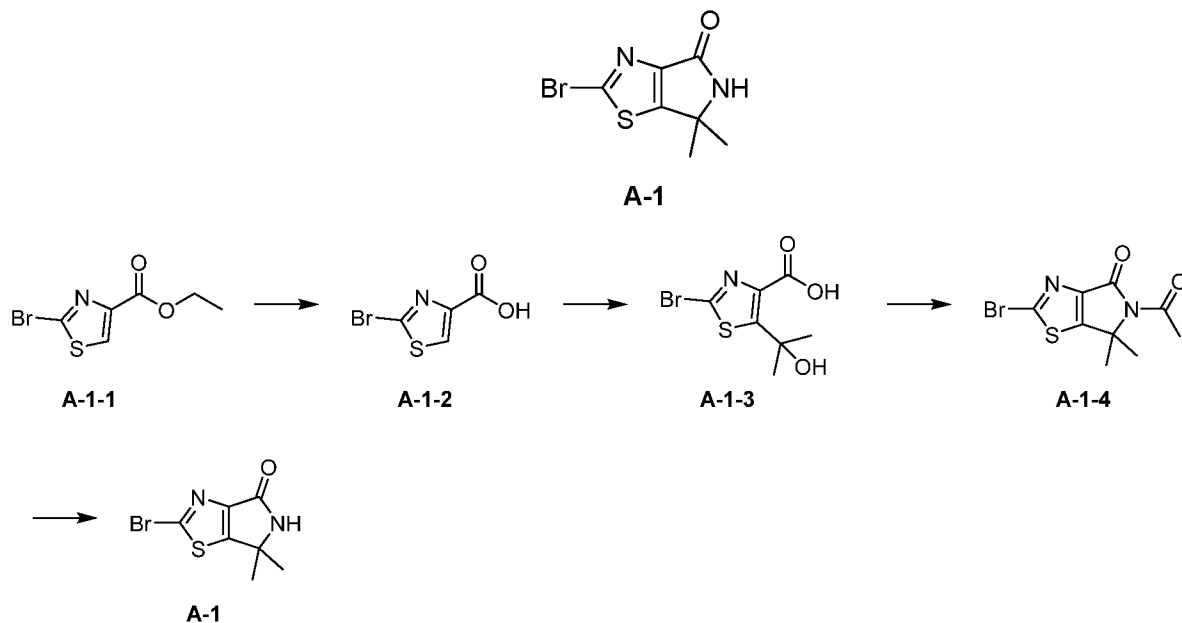
Фиг. 1: Кривая роста опухоли меланомы человека A375 в животной модели после введения растворителя и WX001;

Фиг. 2: Скорость изменения веса у модельных животных с меланомой человека A375 при введении растворителя и WX001.

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение подробно описано ниже с помощью примеров. Однако настоящее изобретение не ограничивается только приведенными примерами. Настоящее изобретение и варианты его осуществления подробно описаны в данной заявке. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что в описанные в настоящем тексте варианты осуществления могут быть внесены различные изменения и модификации без выхода за рамки сути и объема изобретения.

### Сравнительный пример 1



#### Стадия 1: Синтез соединения **A-1-2**.

В реакционную колбу помещали **A-1-1** (500 г, 2.12 моль, 1 экв.), воду (1875 мл) и тетрагидрофуран (1875 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом, затем добавляли моногидрат гидроксида лития (97.76 г, 2.33 моль, 1.1 экв.) и перемешивали реакционную смесь при 25 °С в течение 3 часов. После окончания реакции смесь упаривали для удаления органического растворителя и затем добавляли ледяную воду (2 л). Затем медленно добавляли 4н. раствор соляной кислоты (600 мл), доводя рН до 2-3. Полученную смесь перемешивали 20 минут и затем фильтровали. Осадок на фильтре промывали водой (1 л) и ацетонитрилом (500 мл). Осадок на фильтре собирали. Осадок с фильтра добавляли в ацетонитрил (1 л), и смесь перемешивали 0.5 часа. Полученную смесь фильтровали, и осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (500 мл). Осадок на фильтре собирали и сушили в термошкафу, получая **A-1-2**. <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 13.32 (ушир.с, 1H), 8.46 (с, 1H).

#### Стадия 2: Синтез соединения **A-1-3**.

В реакционную колбу помещали **A-1-2** (175 г, 823.55 ммоль, 97.9% чистота, 1 экв.)

и 2-метилтетрагидрофуран (1.75 л). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом и охлаждали реакционную смесь до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Диизопропиламид лития (2 М, 905.90 мл, 2.2 экв.) медленно добавляли по каплям, и реакционную смесь перемешивали при  $-30^{\circ}\text{C}$  еще 1 час. Затем медленно добавляли по каплям раствор ацетона (95.66 г, 1.65 моль, 121.09 мл, 2 экв.) и 2-метилтетрагидрофурана (175 мл), и реакционную смесь перемешивали при  $-30^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. После окончания реакции гасили реакцию насыщенным водным раствором хлорида аммония (1750 мл) и доводили рН до 3-4 4н. раствором соляной кислоты (около 2 л). Слои разделяли, и водную фазу экстрагировали этилацетатом (3000 мл x 2). Органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (1500 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат собирали и упаривали при пониженном давлении досуха, получая сырой продукт. Добавляли к сырому продукту метил-трет-бутиловый эфир (3.5 л), и реакционную смесь перемешивали 30 минут. Добавляли н-гексан (3.5 л), и реакционную смесь перемешивали еще 4 часа. Полученную смесь фильтровали и собирали осадок на фильтре, получая **A-1-3**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 13.28 (ушир.с, 1H), 6.67-5.90 (ушир.с, 1H), 1.62 (с, 6H).

#### Стадия 3: Синтез соединения **A-1-4**.

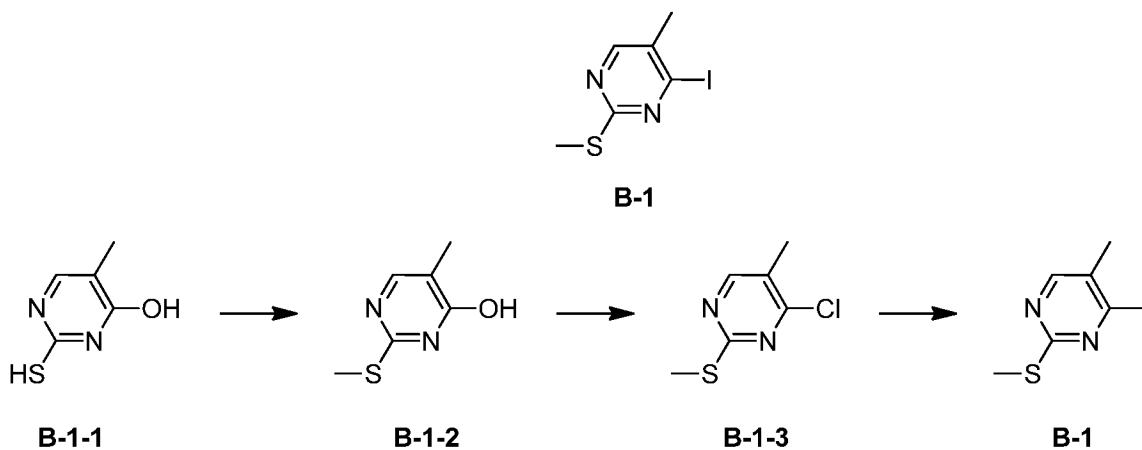
В реакционную колбу помещали **A-1-3** (200 г, 668.89 ммоль, 89% чистота, 1 экв.) и ацетонитрил (2 л). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом и добавляли трифторид бора в диэтиловом эфире (265.82 г, 1.87 моль, 231.15 мл, 2.8 экв.). Полученную смесь перемешивали при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 8 часов. После окончания реакции добавляли этанол (200 мл) в реакционный раствор, и смесь упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Затем полученный сырой продукт медленно выливали в воду (2000 мл). Полученную смесь перемешивали 30 минут и фильтровали. Осадок на фильтре собирали. Безводный этанол (600 мл) добавляли к осадку на фильтре, полученную смесь перемешивали 30 минут и фильтровали. Осадок на фильтре промывали этанолом (200 мл). Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **A-1-4**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 2.49 (с, 3H), 1.77 (с, 6H).

#### Стадия 4: Синтез соединения **A-1**.

В реакционную колбу помещали **A-1-4** (150 г, 481.93 ммоль, 92.9% чистота, 1 экв.) и этанол (750 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом и медленно добавляли по каплям бромоводород (1.07 кг, 5.30 моль, 719.67 мл, 40% чистота, 11 экв.). Полученную смесь перемешивали при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор дихлорметан (1.5 л) и ледяную воду (500 мл), и смесь доводили до рН 7-8 добавлением 4н. водного раствора гидроксида натрия (около 1500 мл). Слои разделяли, водную фазу экстрагировали дихлорметаном (1000 мл x 2), получая

органическую фазу, которую промывали насыщенным раствором хлорида натрия (1000 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. К сырому продукту добавляли этилацетат (225 мл) и н-гексан (225 мл), и полученную смесь перемешивали в течение 2 часов. Смесь фильтровали и собирали осадок на фильтре, получая **A-1**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.88 (с, 1H), 1.51 (с, 6H).

### Сравнительный пример 2



#### Стадия 1: Синтез соединения **B-1-2**.

В реакционную колбу помещали гидроксид натрия (590.8 г, 14.8 моль, 1.05 экв.), воду (20 л) и **B-1-1** (2000.00 г, 14.07 моль, 1 экв.). Затем добавляли метилиодид (2495.80 г, 17.59 моль, 1.25 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. После окончания реакции медленно добавляли в реакционную колбу бн. водный раствор соляной кислоты, доводя значение pH до 6~7. Полученную смесь перемешивали 0.5 часа и фильтровали. Осадок на фильтре собирали. Ацетонитрил (500 мл) добавляли к осадку на фильтре. Полученную смесь перемешивали 0.5 часа и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили в термошкафу, получая **B-1-2**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 12.69 (ушир.с, 1H), 7.74 (ушир.с, 1H), 2.45 (с, 3H), 1.86 (с, 3H).

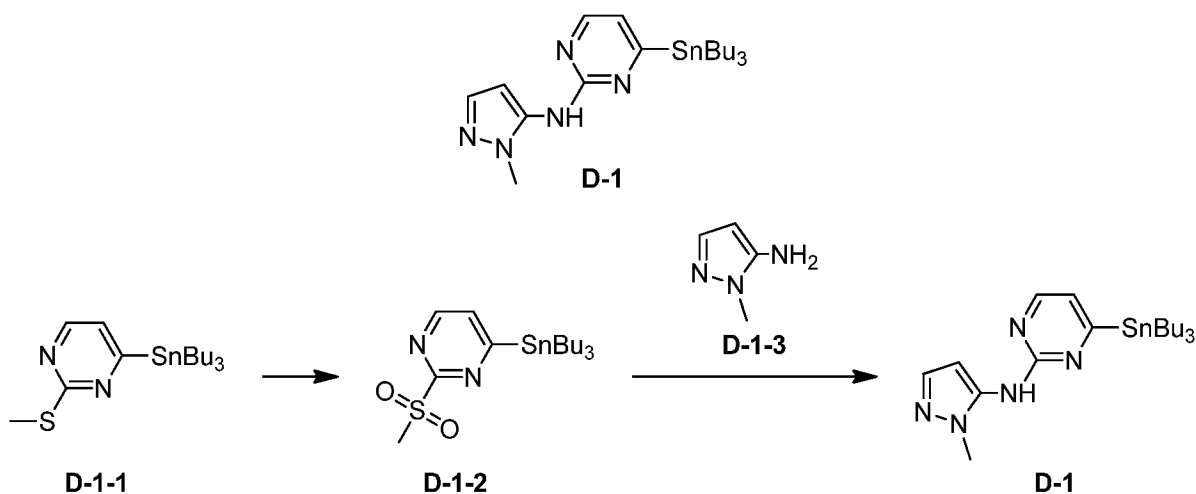
#### Стадия 2: Синтез соединения **B-1-3**.

В реакционную колбу помещали ацетонитрил (15 л) и **B-1-2** (1500.00 г, 9.60 моль, 1 экв.) при 25°C. Затем добавляли оксихлорид фосфора (1840.00 г, 12.0 моль, 1.25 экв.). Полученную смесь медленно нагревали до 62°C и перемешивали при 62°C в течение 12 часов. Реакционный раствор выливали в воду (10.5 л) и добавляли твердый бикарбонат натрия, доводя значение pH до 6-7. Полученную смесь экстрагировали этилацетатом (10.5 л) и разделяли слои, получая органическую фазу. Органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (7.5 л), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая **B-1-3**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.54 (с, 1H), 2.50 (с, 3H), 2.22 (с, 3H).

### Стадия 3: Синтез соединения **B-1**.

В реакционную колбу помещали **B-1-3** (100 г, 572.57 ммоль, 1 экв.), воду (24.76 г, 1.37 моль, 2.4 экв.) и ацетонитрил (1000 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Последовательно добавляли иодид натрия (571.59 г, 3.81 моль, 6.66 экв.) и триметилхлорсилан (186.61 г, 1.72 моль, 218.00 мл, 3 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 14 часов. После окончания реакции последовательно добавляли в реакционный раствор дихлорметан (800 мл) и воду (12000 мл). Затем добавляли твердый бикарбонат натрия, доводя значение pH до 6-7. Слои разделяли, и водную фазу экстрагировали один раз дихлорметаном (500 мл). Органические фазы объединяли, промывали последовательно насыщенным водным раствором сульфита натрия (500 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (500 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Добавляли к сырому продукту н-гептан (0.5 л) и перемешивали реакционную смесь 1 час. Полученную смесь фильтровали, и осадок на фильтре собирали, получая **B-1**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 8.34 (с, 1H), 2.48 (с, 3H), 2.21 (с, 3H).

### Сравнительный пример 3



### Стадия 1: Синтез соединения **D-1-2**.

В высушенную реакционную колбу помещали ацетат натрия (4.54 г, 55.39 ммоль, 5 экв.), моноперсульфат калия (13.62 г, 22.16 ммоль, 2 экв.) и воду (46 мл). Полученную смесь охлаждали до 0°C и добавляли раствор **D-1-1** (4.6 г, 11.08 ммоль, 1 экв.) в метаноле (46 мл) и тетрагидрофуране (46 мл). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. После окончания реакции гасили реакцию насыщенным водным раствором сульфита натрия (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (50 мл x 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном

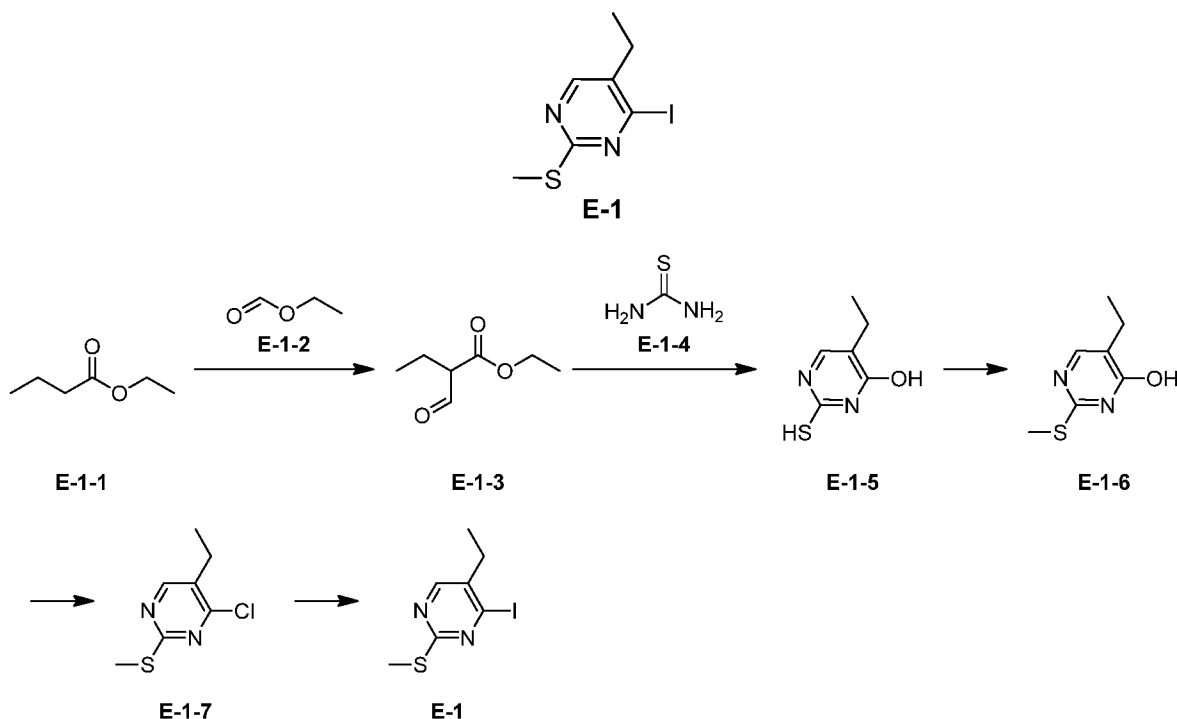


давлении на водоструйном насосе, получая **D-1-2**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.66-8.67 (д,  $J = 4.60$  Гц, 1 H), 7.64-7.65 (д,  $J = 4.82$  Гц, 1 H), 3.37 (с, 3 H), 1.36-1.57 (м, 6 H), 1.33-1.35 (м, 6 H), 1.21-1.23 (м, 6 H), 0.88-0.95 (м, 9 H).

Стадия 2: Синтез соединения **D-1**.

В высушенную реакционную колбу помещали **D-1-2** (4.68 г, 10.46 ммоль, 1 экв.), **D-1-3** (1.22 г, 12.56 ммоль, 1.2 экв.) и тетрагидрофуран (70 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Гексаметилдисилазид лития (1 М, 21.98 мл, 2.1 экв.) добавляли по каплям при  $-30^\circ\text{C}$ . Полученную смесь перемешивали при  $-30^\circ\text{C}$  в течение 2 часов. После окончания реакции выливали реакционный раствор в насыщенный водный раствор хлорида аммония (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3). Органические фазы объединяли. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая **D-1**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.17 (д,  $J = 4.65$  Гц, 1 H), 7.45 (д,  $J = 1.96$  Гц, 1 H), 6.91 (д,  $J = 4.65$  Гц, 1 H), 6.79 (ушир.с, 1 H), 6.31 (д,  $J = 1.96$  Гц, 1 H), 3.78 (с, 3 H), 1.43-1.64 (м, 6 H), 1.24-1.38 (м, 6 H), 1.07-1.14 (м, 6 H), 0.89 (т,  $J = 7.34$  Гц, 9 H).

#### Сравнительный пример 4



Стадия 1: Синтез соединения **E-1-3**.

В реакционную колбу помещали трет-бутоксид калия (4.83 г, 43.04 ммоль, 2.5 экв.) и тетрагидрофуран (16 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Медленно добавляли по каплям раствор **E-1-1** (2 г, 17.22 ммоль, 2.30 мл, 1 экв.) и **E-1-1** (2.55 г, 34.44

ммоль, 2.77 мл, 2 экв.) в тетрагидрофуране (16 мл). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. После окончания реакции смесь упаривали, получая **E-1-3**.

Стадия 2: Синтез соединения **E-1-5**.

В реакционную колбу помещали **E-1-3** (2.24 г, 17.21 ммоль, 1 экв.) и изопропанол (140 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли **E-1-4** (2.62 г, 34.42 ммоль, 2 экв.) и перемешивали реакционную смесь при 90°C в течение 12 часов. После окончания реакции упаривали реакционный раствор при пониженном давлении, получая сырой продукт. Добавляли 20 мл воды к сырому продукту, реакционную смесь доводили до pH 4 добавлением уксусной кислоты и фильтровали. Осадок на фильтре собирали. Осадок на фильтре очищали методом колоночной хроматографии, получая **E-1-5**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 12.25 (ушир.с, 2H), 7.22 (с, 1H), 2.21 (кв, *J* = 7.5 Гц, 2H), 1.01 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

Стадия 3: Синтез соединения **E-1-6**.

В реакционную колбу помещали гидроксид натрия (1.34 г, 33.61 ммоль, 1.05 экв.) и воду (50 мл), затем добавляли соединение **E-1-5** (5 г, 32.01 ммоль, 1 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 10°C и медленно добавляли метилиодид (5.68 г, 40.01 ммоль, 2.49 мл, 1.25 экв.). Полученную смесь перемешивали при 10°C в течение 0.5 часа, медленно нагревали до 25°C и перемешивали еще 2.5 часа. После окончания реакции охлаждали реакционный раствор до 0~5°C, затем доводили pH до 7~8 добавлением бн. раствора соляной кислоты и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **E-1-6**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 12.64 (ушир.с, 1H), 7.70 (ушир.с, 1H), 2.45 (с, 3H), 2.29 (кв, *J* = 7.4 Гц, 2H), 1.06 (т, *J* = 7.4 Гц, 3H).

Стадия 4: Синтез соединения **E-1-7**.

В реакционную колбу помещали **E-1-6** (7.4 г, 43.47 ммоль, 1 экв.) и ацетонитрил (75 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом, затем медленно добавляли по каплям оксихлорид фосфора (8.33 г, 54.34 ммоль, 5.05 мл, 1.25 экв.). Полученную смесь перемешивали при 62°C в течение 2.5 часов. После окончания реакции выливали реакционный раствор в воду (100 мл) и добавляли твердый карбонат натрия, доводя значение pH до 6-7. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (50 мл x 2). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая **E-1-7**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 8.58 (с, 1H), 2.63 (кв, *J* = 7.5 Гц, 2H), 2.51 (с, 3H), 1.17 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

Стадия 5: Синтез соединения **E-1**.

В реакционную колбу помещали **E-1-7** (3.5 г, 18.55 ммоль, 1 экв.) и ацетонитрил (40 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Последовательно добавляли иодид натрия (18.52 г, 123.54 ммоль, 6.66 экв.), триметилхлорсилан (6.71 г, 61.77 ммоль, 7.84 мл, 3.33 экв.) и воду (802.26 мг, 44.52 ммоль, 802.26 мкл, 2.4 экв.). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. После окончания реакции последовательно добавляли в реакционный раствор дихлорметан (50 мл) и воду (50 мл), и доводили pH до 6-7 добавлением твердого бикарбоната натрия. Слои разделяли. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном (50 мл), органические фазы объединяли. Органическую фазу последовательно промывали насыщенным водным раствором сульфита натрия (50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая **E-1**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 8.32 (с, 1H), 2.58 - 2.52 (м, 2H), 2.48 (с, 3H), 1.13 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

### Пример 1

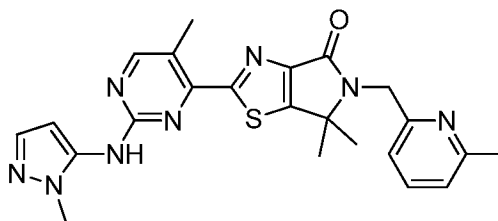
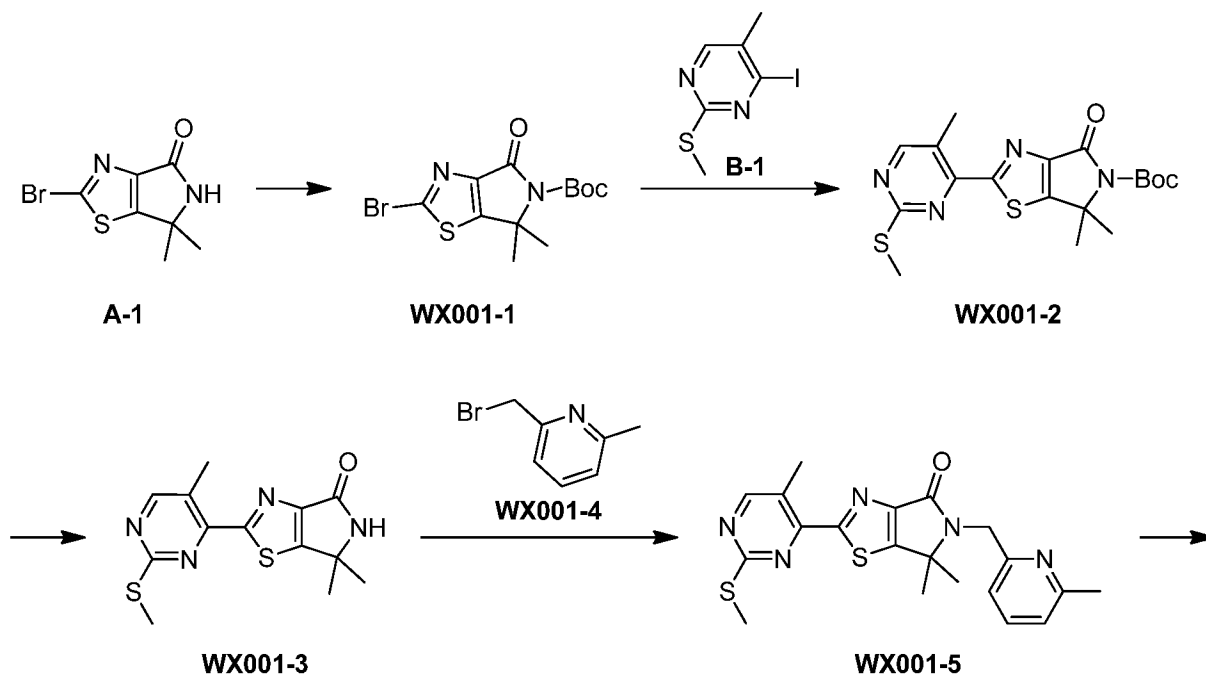
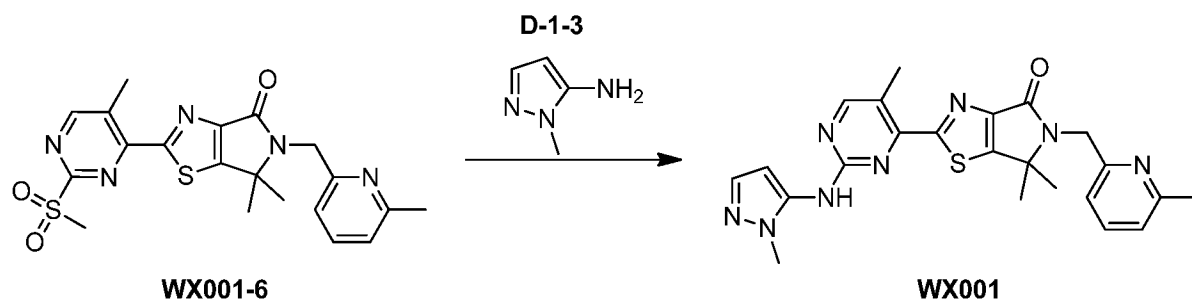


Схема синтеза:





### Стадия 1: Синтез **WX001-1**

В высушенную реакционную колбу помещали **A-1** (70 г, 283.27 ммоль, 1 экв.), дихлорметан (1400 мл), 4-диметиламинопиридин (38.07 г, 311.60 ммоль, 1.1 экв.) и ди-трет-бутил дикарбонат (123.65 г, 566.54 ммоль, 130.15 мл, 2 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор воду (300 мл) и разделяли органическую фазу и водную фазу. Водную фазу экстрагировали три раза дихлорметаном (400 мл). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт суспендировали в н-гексане (140 мл) и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **WX001-1**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 1.75 (с, 6 H), 1.52 (с, 9 H).

### Стадия 2: Синтез **WX001-2**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-1** (10 г, 28.80 ммоль, 1 экв.), тетрагидрофуран (133 мл), раствор хлорида цинка (0.7 М, 41.14 мл, 1 экв.) и тетраметилэтилендиамин (3.35 г, 28.80 ммоль, 4.35 мл, 1 экв.). Полученную смесь охлаждали до -78°C. Добавляли н-бутиллитий (2.5 М, 17.28 мл, 1.5 экв.), и реакционную смесь перемешивали 10 минут. Добавляли еще н-бутиллитий (2.5 М, 5.76 мл, 0.5 экв.), и смесь перемешивали еще 10 минут. Добавляли еще н-бутиллитий (2.5 М, 3.46 мл, 0.3 экв.), и смесь перемешивали при 20°C еще 1 час, получая реакционный раствор 1.

Смесь **B-1** (7.66 г, 28.80 ммоль, 1 экв.), тетракис(трифенилфосфин)палладия (998.39 мг, 863.99 мкмоль, 0.03 экв.) и *N,N*-диметилформамида (67 мл) нагревали до 50°C, получая реакционный раствор 2. Реакционный раствор 1 добавляли по каплям в реакционный раствор 2, и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 40 минут. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор 0.1М водный раствор динатрия этилендиаминтетраацетата (450 мл). Полученную смесь перемешивали 30 минут и фильтровали. Осадок на фильтре собирали, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая **WX001-2**. <sup>1</sup>H ЯМР (400

МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.72 (с, 1H), 2.59 (с, 3H), 2.58 (с, 3H), 1.82 (с, 6H), 1.54 (с, 9H).

#### Стадия 3: Синтез **WX001-3**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-2** (10 г, 24.60 ммоль, 1 экв.), ДХМ (100 мл) и трифторуксусную кислоту (36.49 г, 320.03 ммоль, 23.69 мл, 13.01 экв.). Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 часа. После окончания реакции реакционный раствор упаривали и затем экстрагировали хлороформом (30 мл x 3) для удаления остатков трифторуксусной кислоты, получая **WX001-3**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.89 (с, 1H), 8.72 (с, 1H), 2.61 (с, 3H), 2.59 (с, 3H), 1.57 (с, 6H).

#### Стадия 4: Синтез **WX001-5**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-3** (150 мг, 489.55 мкмоль, 1 экв.), *N,N*-диметилформамид (1.5 мл), карбонат цезия (239.26 мг, 734.32 мкмоль, 1.5 экв.) и **WX001-4** (109.30 мг, 587.46 мкмоль, 1.2 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор воду (10 мл). Полученную смесь фильтровали, получая осадок на фильтре. Осадок на фильтре растворяли в дихлорметане (10 мл) и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (15 мл). Слои разделяли, получая органическую фазу. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая **WX001-5**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  = 8.74 (с, 1H), 7.62 (т,  $J$  = 7.8 Гц, 1H), 7.18 - 7.06 (м, 2H), 4.72 (с, 2H), 2.64 (с, 3H), 2.59 (с, 3H), 2.45 (с, 3H), 1.54 (с, 6H).

#### Стадия 5: Синтез **WX001-6**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-5** (130 мг, 315.88 мкмоль, 1 экв.), ацетонитрил (3 мл), воду (1.5 мл) и моноперсульфат калия (388.39 мг, 631.77 мкмоль, 2 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 16 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор насыщенный водный раствор тиосульфата натрия (10 мл), и реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (10 мл x 3). Органические фазы объединяли, последовательно промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (20 мл x 2) и насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая **WX001-6**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  = 9.18 (с, 1H), 7.62 (т,  $J$  = 7.7 Гц, 1H), 7.13 (д,  $J$  = 7.7 Гц, 2H), 4.73 (с, 2H), 3.48 (с, 3H), 2.82 (с, 3H), 2.45 (с, 3H), 1.57 (с, 6H).

#### Стадия 6: Синтез **WX001**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-6** (140 мг, 315.64 мкмоль, 1

экв.), **D-1-3** (61.31 мг, 631.28 мкмоль, 2 экв.), дихлорметан (1 мл) и тетрагидрофуран (1 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Реакционный раствор охлаждали до 0°C и добавляли по каплям гексаметилдисилазид лития (1 М, 599.72 мкл, 1.9 экв.). После окончания добавления по каплям смесь перемешивали при 0°C в течение еще 2 часов. После окончания реакции гасили реакцию добавлением воды (10 мл) и затем экстрагировали дихлорметаном (10 мл x 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (15 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Waters Xbridge ВЕН С18 100\*30мм\*10мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; В (ацетонитрил) %: 25%-55%, 8 мин), получая **WX001**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 9.61 (с, 1 H), 8.60 (с, 1 H), 7.61 (т, *J* = 7.69 Гц, 1 H), 7.39 (д, *J* = 1.88 Гц, 1 H), 7.12 (дд, *J* = 7.57, 3.56 Гц, 2 H), 6.34 (д, *J* = 1.88 Гц, 1 H), 4.71 (с, 2 H), 3.72 (с, 3 H), 2.58 (с, 3 H), 2.45 (с, 3 H), 1.53 (с, 6 H); LCMS *m/z* : 461 [M + H]<sup>+</sup>.

### Пример 2

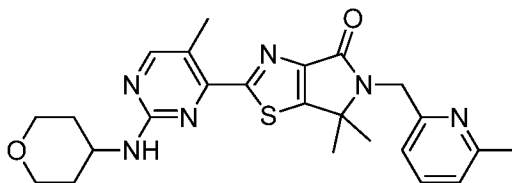
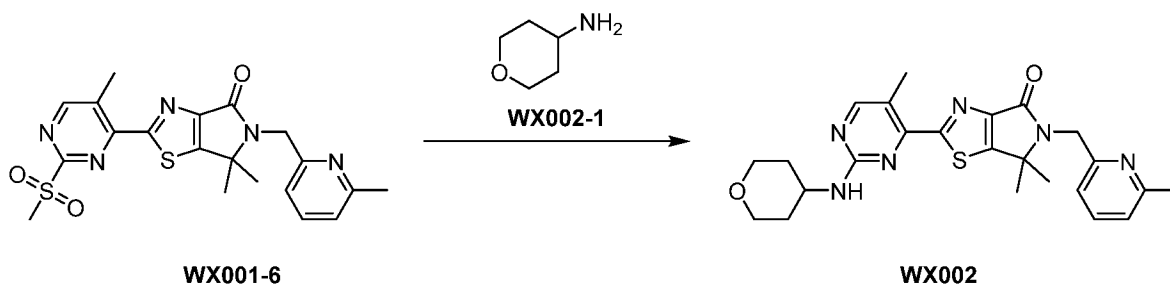


Схема синтеза:



Стадия 1: Синтез **WX002**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-6** (180 мг, 405.82 мкмоль, 1 экв.), **WX002-1** (246.29 мг, 2.43 ммоль, 6 экв.) и ДМСО (1 мл). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 часов. После окончания реакции реакционный раствор напрямую разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Phenomenex С18 80\*40мм\*3мкм; подвижная фаза: [вода (бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; В (ацетонитрил) %: 25%-55%, 8 мин), получая **WX002**. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 400 МГц) δ = 8.40 (с, 1H), 7.61 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.2-7.4 (м, 1H), 7.12 (дд, *J* = 4.8, 7.7 Гц, 2H), 4.6-4.8 (м, 2H), 3.8-4.0 (м, 3H), 3.4-3.5 (м, 2H), 2.52 (с, 3H), 2.45 (с, 3H), 1.89 (дд, *J* =

1.5, 12.0 Гц, 2H), 1.5-1.6 (м, 2H), 1.52 (с, 6H); LCMS  $m/z$ : 465 [M + H]<sup>+</sup>.

### Пример 3

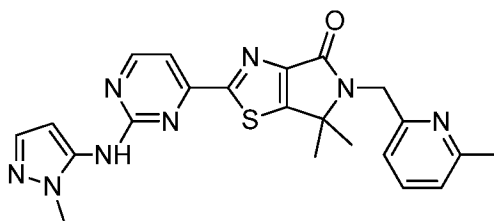
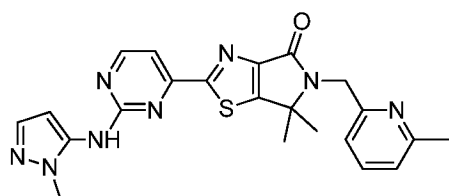
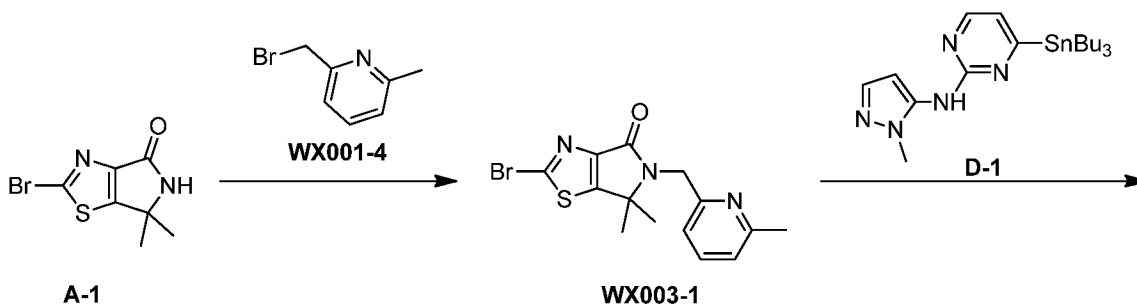


Схема синтеза



**WX003**

#### Стадия 1: Синтез **WX003-1**

В высушенную реакционную колбу помещали **A-1** (500 мг, 2.02 ммоль, 1 экв.), *N,N*-диметилформаид (5 мл), карбонат цезия (988.88 мг, 3.04 ммоль, 1.5 экв.) и **WX001-4** (451.74 мг, 2.43 ммоль, 1.2 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор воду (20 мл), и реакционную смесь фильтровали. Осадок на фильтре растворяли в дихлорметане (10 мл) и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (15 мл x 3). Слои разделяли, получая органическую фазу. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая **WX003-1**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 7.60 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.09 (дд, *J* = 7.7, 13.8 Гц, 2H), 4.66 (с, 2H), 2.44 (с, 3H), 1.48 (с, 6H).

#### Стадия 2: Синтез **WX003**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX003-1** (150 мг, 425.84 мкмоль, 1 экв.), **D-1** (217.46 мг, 468.42 мкмоль, 1.1 экв.) и толуол (3 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Затем добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (98.42 мг,

85.17 мкмоль, 0.2 экв.). Полученную смесь нагревали до 110°C и перемешивали 12 часов. После окончания реакции напрямую упаривали реакционный раствор при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт сначала очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем и затем очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Waters Xbridge ВЕН С18 100\*25мм\*5мкм; подвижная фаза: [вода (бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; В (ацетонитрил) %: 20%-50%, 10 мин), получая **WX003**. <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.79 (с, 1H), 8.69 (д, *J* = 5.0 Гц, 1H), 7.61 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.54 (д, *J* = 5.0 Гц, 1H), 7.40 (д, *J* = 1.9 Гц, 1H), 7.11 (т, *J* = 6.8 Гц, 2H), 6.33 (д, *J* = 1.6 Гц, 1H), 4.71 (с, 2H), 3.72 (с, 3H), 2.45 (с, 3H), 1.53 (с, 6H); LCMS *m/z* : 447 [M + H]<sup>+</sup>.

#### Пример 4

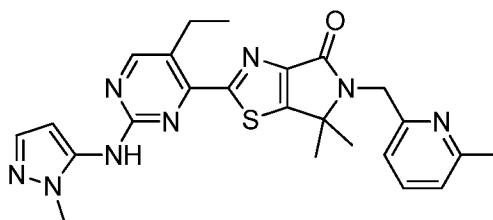
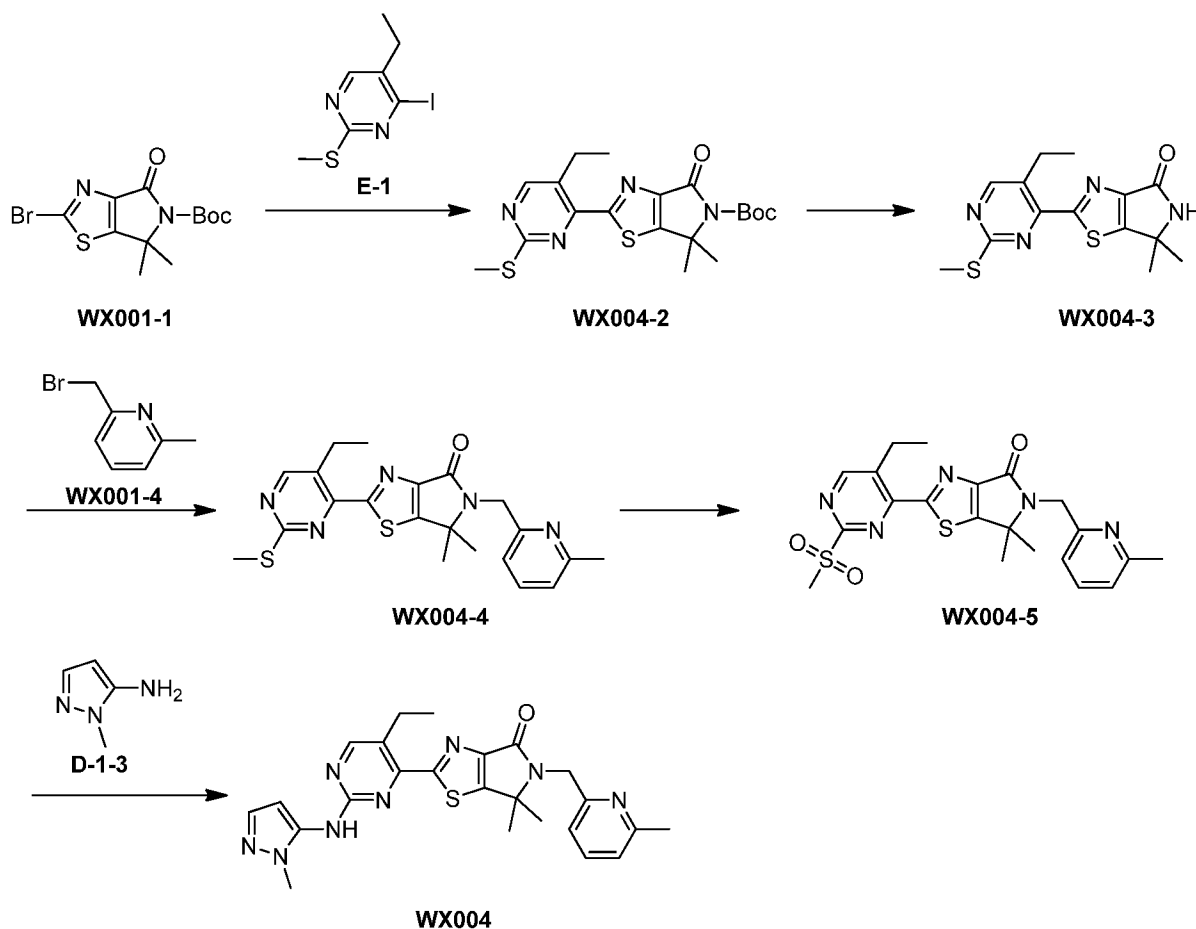


Схема синтеза



Стадия 1: Синтез **WX004-2**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-1** (500.00 мг, 1.44 ммоль, 1



экв.), тетрагидрофуран (6.5 мл), раствор хлорида цинка (0.7 М, 2.06 мл, 1 экв.) и тетраметилэтилендиамин (167.33 мг, 1.44 ммоль, 217.32 мкл, 1 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до  $-78^{\circ}\text{C}$ . Добавляли по каплям *n*-бутиллитий (2.5 М, 863.99 мкл, 1.5 экв.) и перемешивали реакционную смесь 10 минут. Добавляли еще *n*-бутиллитий (2.5 М, 288.00 мкл, 0.5 экв.) и перемешивали смесь еще 10 минут. Добавляли еще *n*-бутиллитий (2.5 М, 172.80 мкл, 0.3 экв.). После окончания добавления смесь перемешивали при  $20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа, получая реакционный раствор 1.

Смесь **E-1** (403.38 мг, 1.44 ммоль, 1 экв.), тетракис(трифенилфосфин)палладия (49.92 мг, 43.20 мкмоль, 0.03 экв.) и *N,N*-диметилформамида (3.5 мл) нагревали до  $50^{\circ}\text{C}$  в атмосфере азота и затем добавляли описанный выше реакционный раствор 1. Полученную смесь перемешивали при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение еще 40 минут. После окончания реакции гасили реакцию насыщенным водным раствором хлорида аммония (20 мл) и экстрагировали этилацетатом (20 мл x 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая **WX004-2**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.79 (с, 1 H), 3.14 (д,  $J = 7.34$  Гц, 2 H), 2.60 (с, 3 H), 1.82 (с, 6 H), 1.54 (с, 9 H), 1.22 (т,  $J = 7.40$  Гц, 3 H).

#### Стадия 2: Синтез **WX004-3**

В реакционную колбу помещали **WX004-2** (200 мг, 475.57 мкмоль, 1 экв.) и дихлорметан (5 мл). Полученную смесь охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$ . Добавляли в реакционную колбу трифторуксусную кислоту (108.45 мг, 951.14 мкмоль, 70.42 мкл, 2 экв.) и перемешивали смесь при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. После окончания реакции реакционный раствор медленно выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (20 мл) и доводили рН до 7~8. Полученную смесь экстрагировали дихлорметаном (10 мл x 2). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая **WX004-3**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (м.д.) = 8.90 (с, 1 H), 8.75 (с, 1 H), 3.15 (кв,  $J = 7.40$  Гц, 2 H), 2.59 (с, 3 H), 1.58 (с, 6 H), 1.22 (т,  $J = 7.40$  Гц, 3 H).

#### Стадия 3: Синтез **WX004-4**

В реакционную колбу помещали **WX004-3** (225 мг, 702.18 мкмоль, 1 экв.), карбонат цезия (343.17 мг, 1.05 ммоль, 1.5 экв.) и *N,N*-диметилформамид (5 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли **WX001-4** (156.77 мг, 842.61 мкмоль, 1.13

мл, 1.2 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. После окончания реакции реакционный раствор выливали в смесь воды и льда (200 мл). Полученную смесь перемешивали 0.5 часа и фильтровали. Осадок на фильтре азеотропно осушали толуолом (5 мл x 3), получая **WX004-4**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 8.77 (с, 1 H), 7.60-7.64 (т, *J* = 7.67 Гц, 1 H), 7.11-7.13 (д, *J* = 7.67 Гц, 2 H), 4.72 (с, 2 H), 3.18 (кв, *J* = 7.38 Гц, 2 H), 2.60 (с, 3 H), 2.45 (с, 3 H), 1.54 (с, 6 H), 1.24 (т, *J* = 7.45 Гц, 3 H).

#### Стадия 4: Синтез **WX004-5**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX004-4** (100 мг, 234.98 мкмоль, 1 экв.), воду (1.5 мл) и ацетонитрил (3 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 0°C и порциями добавляли моноперсульфат калия (288.92 мг, 469.96 мкмоль, 2 экв.). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор насыщенный водный раствор сульфита натрия (10 мл). Полученную смесь перемешивали 0.5 часа и затем экстрагировали этилацетатом (10 мл x 2). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая **WX004-5**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ (м.д.) = 8.77 (с, 1H), 7.62 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.12 (д, *J* = 7.7 Гц, 2H), 4.72 (с, 2H), 3.18 (кв, *J* = 7.4 Гц, 2H), 2.60 (с, 3H), 2.45 (с, 3H), 1.54 (с, 6H), 1.24 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H).

#### Стадия 5: Синтез **WX004**

**WX004-5** (55 мг, 120.20 мкмоль, 1 экв.), **D-1-3** (23.35 мг, 240.40 мкмоль, 2 экв.), дихлорметан (1 мл) и тетрагидрофуран (1 мл) помещали в реакционную колбу. Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 0°C. Гексаметилдисилазид лития (1 M, 228.38 мкл, 1.9 экв.) добавляли по каплям в реакционную колбу, и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. После окончания реакции гасили реакцию добавлением воды (10 мл) и затем экстрагировали этилацетатом (10 мл x 2). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт сначала очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем и затем разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Waters Xbridge ВЕН С18 100\*30мм\*10мкм; подвижная фаза: [вода (бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; В (ацетонитрил) %: 25%-55%, 8 мин), получая **WX004**. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 400 МГц) δ (м.д.) = 9.64 (с, 1H), 8.63 (с, 1H), 7.61 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.39 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H), 7.12 (д, *J* = 7.8 Гц, 2H), 6.34 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H), 4.71 (с,

2H), 3.72 (с, 3H), 3.12 (кв,  $J = 7.3$  Гц, 2H), 2.45 (с, 3H), 1.53 (с, 6H), 1.22 (т,  $J = 7.4$  Гц, 3H); LCMS  $m/z$  : 475  $[M + H]^+$ .

### Пример исследования 1. Исследование активности киназы *in vitro*

1. Цель исследования:

Определяли способность соединений ингибировать активность киназ ERK1 и ERK2.

2. Буфер для проведения исследования:

20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM этиленбис(оксиэтиленнитрило) тетрауксусная кислота (EGTA), 0.02% Brij35, 0.02 мг/мл альбумин бычьей сыворотки (BSA), 0.1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM дитиотреитол (DTT), 1% ДМСО.

3. Подготовка соединения:

Исследуемое соединение растворяли в 100% ДМСО для приготовления стокового раствора определенной концентрации. Проводили серийные разведения соединения в ДМСО с помощью пипетки Integra Viaflo Assist smart pipette.

4. Методика проведения исследования:

a) Готовили раствор субстрата MBP в свежеприготовленном реакционном буфере;

b) ERK1 (или ERK2) киназу добавляли в описанный выше раствор MBP и осторожно перемешивали;

c) Растворенное в 100% ДМСО соединение добавляли в реакционный раствор с киназой, используя ультразвуковую технологию (Echo550; нанолитровый диапазон), и реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре 20 минут;

d) <sup>33</sup>P-АТФ (концентрация 10 мкКи/мкл) добавляли в реакционную систему, и в этот момент начиналась реакция;

e) Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов;

f) Уровень радиоактивности детектировали методом связывания с фильтром;

g) Активность ERK1 (или ERK2) киназы вычисляли как соотношение остаточной активности киназы в исследуемом образце с активностью киназы в контрольной группе (добавляли только ДМСО). Строили кривую с помощью программы Prism (GraphPad software) и вычисляли значения IC<sub>50</sub>.

5. Результаты исследования приведены в Таблице 1 и Таблице 2:

Таблица 1: Результат исследования активности ERK1 киназы

Соединение	ERK1
	IC <sub>50</sub> (нМ)
WX001	1.2

Вывод: Соединение по настоящему изобретению проявляет прекрасную ингибирующую активность в отношении ERK1 киназы.

Таблица 2: Результат исследования активности ERK2 киназы

Соединение	ERK2
	IC <sub>50</sub> (нМ)
WX001	0.49
WX002	0.47
WX003	0.93
WX004	0.34

Вывод: Соединения по настоящему изобретению проявляют прекрасную ингибирующую активность в отношении ERK1 киназы.

## Пример исследования 2. Исследование ингибирование пролиферации клеток *in vitro*

### 1. Цель исследования:

Оценивали способность соединений ингибировать пролиферацию опухолевых клеток HT29.

### 2. Подготовка соединения:

Исследуемое соединение растворяли в 100% ДМСО для получения 10 мМ стокового раствора.

### 3. Методика проведения исследования:

а) Включали УФ-свет в камере биологической безопасности и засекали 30 минут;

б) На водяной бане 37 °С предварительно нагревали среду RPMI1640 и трипсин;

с) После окончания УФ-облучения открывали камеру биологической безопасности. Предварительно нагретую среду, трипсин и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) протирали спиртом и помещали в камеру биологической безопасности;

д) HT29 клетки извлекали из инкубатора, и старую среду удаляли в камере биологической безопасности. Добавляли 10 мл PBS. Полученную смесь осторожно встряхивали и затем удаляли PBS;

е) Добавляли 1.5 мл предварительно нагретого 0.25% трипсина. Сосуд с

культурой встряхивали горизонтально, так чтобы трипсин равномерно покрыл клетки на дне, и помещали в инкубатор на 2 минуты;

f) Растворение клеток останавливали добавлением полной среды, суспензию клеток перемешивали пипетированием до гомогенности и производили подсчет;

g) По результатам подсчета клеток довели плотность суспензии клеток до 1500 клеток на лунку, и высевали суспензию клеток в количестве 50 мкл на лунку;

h) Стоковые растворы соединений подвергали серийным разведениям в ДМСО и добавляли соединения в планшет с клетками, используя Tescan;

i) Планшет с клетками и добавленными соединениями, а также CellTiterGlo уравнивали при комнатной температуре и затем в каждую лунку добавляли 25 микролитров CellTiterGlo. Планшет с клетками встряхивали 1-2 минуты и затем оставляли на 10 минут. Затем измеряли интенсивность сигнала. Полученные данные анализировали с помощью XL-Fit и вычисляли значение IC<sub>50</sub> для каждого соединения.

4. Результаты исследования приведены в Таблице 3:

Таблица 3: Результаты исследования активности клеток *in vitro*

Соединение	HT29
	IC <sub>50</sub> (нМ)
<b>WX001</b>	21
<b>WX002</b>	46

Вывод: Соединения по настоящему изобретению проявляют прекрасную ингибирующую активность в отношении пролиферации HT29 клеток.

### Пример исследования 3. Исследование фармакокинетики на мышях

1. Цель исследования:

Самки мышей BALB/c использовались в качестве лабораторных животных для определения концентрации соединения в крови и определения фармакокинетических параметров после однократного введения.

2. Методика проведения исследования:

Отбирали четыре здоровых взрослых самки мышей BALB/c, из которых 2 мыши были в группе с внутривенным инъекционным введением и 2 мыши – в группе с пероральным введением. Носитель для группы с внутривенным инъекционным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с нужным количеством носителя для внутривенного введения, перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали в ультразвуковой бане для получения прозрачного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл. Полученный прозрачный раствор фильтровали через

микропористую мембрану, после этого он был готов к использованию. Носитель для группы с пероральным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с носителем, перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали в ультразвуковой бане для получения прозрачного раствора с концентрацией 0.3 мг/мл. Мышам вводили 1 мг/кг внутривенно или 3 мг/кг перорально, и затем отбирали образцы цельной крови в течение необходимого периода времени. Получали плазму крови. Определяли концентрацию лекарства методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA).

Примечание: ДМСО = диметилсульфоксид; HP-β-CD: гидроксипропил-β-циклодекстрин.

3. Результаты исследования приведены в Таблице 4:

Таблица 4: Результаты исследования фармакокинетики соединения

Соединение	$C_{\text{макс}}$ (нМ)	F%	Перорально DNAUC (нМ.ч / мг/кг)	$V_{d_{ss}}$ (л/кг)	Cl (мл/мин/кг)	$T_{1/2}$ (ч)
<b>WX001</b>	2115	62%	787.18	1.6	27.5	1.29

Примечание:  $C_{\text{макс}}$  = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC =  $AUC_{\text{PO}}/\text{Доза}$ ,  $AUC_{\text{PO}}$  = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства;  $V_{d_{ss}}$  = объем распределения; Cl = скорость выведения; и  $T_{1/2}$  = время полужизни.

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует прекрасную концентрацию при пероральном введении и биодоступность.

#### Пример исследования 4. Исследование растворимости

1. Цель исследования:

Определяли растворимость соединения для оценки характеристик растворимости соединения.

2. Раствор для проведения исследования:

1) Буфер А (pH 2.0): 50 мМ фосфатный буфер, pH 2.0; Буфер В (pH 6.5): 50 мМ фосфатный буфер, pH 6.5; Буфер С (pH 7.4): 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4;

2) Приготовление стандартного раствора:

а) Смешивали 50% ацетонитрила и 50% буферного раствора для приготовления разбавителя;

б) 10 мМ (10 мкл/соединение) стокового раствора соединения добавляли в

разбавитель (490 мкл/соединение), получая 200 мкМ стандартный раствор для детектирования;

с) Полученный 200 мкМ стандартный раствор для УФ-детектирования разводили 10-кратным и 200-кратным объемом разбавителей, получая 20 мкМ и 1 мкМ стандартные растворы для УФ-детектирования, соответственно;

d) 1 мкМ, 20 мкМ и 200 мкМ стандартные растворы для УФ-детектирования использовали как стандартные растворы для исследования растворимости.

3. Методика проведения исследования:

a) Соединение растворяли в ДМСО с получением 10 мМ стокового раствора. Амиодарон гидрохлорид, карбамазепин и хлорамфеникол использовали как стандартные растворы для исследования растворимости;

b) Стоковые растворы исследуемого соединения и контроль (по 10 мкл каждого) помещали в 96-луночный планшет и добавляли 490 мкл трех разных растворяющих сред (буфер А, В, С), соответственно. Значение рН соответствующих растворов составляло 2.0, 6.5 и 7.4, соответственно. Теоретическая максимальная концентрация исследуемого соединения составляла 200 мкМ с 2% ДМСО;

с) Планшет встряхивали на шейкере при комнатной температуре ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) при 600 об/мин в течение 24 часов;

d) 200 мкл раствора отбирали пипеткой из 96-луночного планшета, фильтровали при отсасывании вакуумом и переносили в новый 96-луночный планшет в качестве образца для исследования;

e) Концентрацию соединения определяли с помощью ВЭЖХ-УФ. Условия ВЭЖХ приведены в Таблице 5:

Таблица 5: Условия ВЭЖХ

Метод анализа	ВЭЖХ-УФ детектирование		
Прибор	Agilent 1200		
Подвижная фаза	А: Вода + 0.37% трифторуксусная кислота В: Ацетонитрил+0.19% трифторуксусная кислота		
Колонка	Waters Xbridge RP-C18 (2.1×50 мм, 5 мкм)		
Соотношение	Время (мин)	В%	Скорость потока (мл/мин)
	0.00	5	1.0
	2.00	90	1.0
	2.50	90	1.0
	3.01	5	1.0
	4.00	5	1.0

f) Три стандартных раствора для УФ-детектирования от низшей до высшей концентрации (1 мкМ, 20 мкМ, 200 мкМ) закачивали в ВЭЖХ хроматограф, и затем

закальывали исследуемый образец тестируемого соединения;

g) Интегрировали УФ-хроматографические пики и вычисляли растворимость образца.

4. Результаты исследования приведены в Таблице 6:

Таблица 6: Результаты исследования растворимости соединения

Соединение	Растворимость при разных значениях pH		
	pH=2.0	pH=6.5	pH=7.4
<b>WX001</b>	>200.00 мкМ	6.2 мкМ	7.08 мкМ

Вывод: Соединение по настоящему изобретению имеет хорошую растворимость при разных значениях pH.

#### Пример исследования 5. Исследование *in vivo* эффективности в мышинной модели меланомы человека A375:

1. Цель исследования:

Оценивали противоопухолевое действие **WX001**, используя подкожную ксенотрансплантатную модель опухоли с клетками меланомы человека A375 у бестимусных мышей.

2. Подопытные животные:

Вид: мышь

Линия: BALB/c бестимусная мышь

Возраст: 6-8 недель

Пол: женский

Вес тела: 18-22 грамм

Поставщик: Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

3. Условия содержания:

Животных содержали в клетках с индивидуальной вентиляцией (независимая система подачи воздуха, постоянная температура и влажность) (3 животных в клетке) в условиях отсутствия специфической патогенной микрофлоры при температуре 20-26°C и влажности 40-70%;

Клетка: Клетка изготовлена из поликарбоната и имеет объем 375 мм x 215 мм x 180 мм. Материалом подстилки служили стержни кукурузных початков, которые меняли раз в неделю;

Пища: Подопытные животные имели свободный доступ к еде (сухой пеллетированный корм, стерилизованный облучением) на протяжении всего времени исследования;



Питьевая вода: Подопытные животные имели свободный доступ к стерилизованной воде;

Идентификация клеток: Информационная табличка на каждой клетке включала число, пол, линию, дату получения, нумерацию согласно расписанию введения, группу и дату начала исследования на животных;

Идентификация животных: Подопытные животные имели идентификационные бирки на ухе.

#### 4. Методика исследования:

1) Клетки и культуры для исследования: Клетки меланомы человека A375 выращивали в монослое *in vitro*. Условия выращивания: среда DMEM плюс 10% фетальной бычьей сыворотки, инкубатор с температурой 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для рассеивания два раза в неделю применяли рутинную трипсин-ЭДТА обработку. Когда насыщение клеток составляло 80%-90% и количество достигало требуемого, проводили сбор, подсчет и инокуляцию клеток;

2) Инокуляция и группировка опухолевой ткани: 0.1 мл ( $5 \times 10^5$ ) клеток A375 инокулировали подкожно в правую подмышечную впадину каждой мыши. Когда средний объем опухоли достигал 170 мм<sup>3</sup>, животных случайным образом делили на 4 группы и начинали введение. Группировка и расписание введения в данном исследовании показаны в Таблице 7.

Таблица 7: Группировка подопытных животных и расписание введения

Группа	Число животных	Лекарство	Доза (мг/кг)	Цикл введения	Способ и частота введения
1	6	Контроль, растворитель (Носитель)	--	21 день	Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID)
2	6	<b>WX001</b>	5	21 день	Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID)
3	6	<b>WX001</b>	10	21 день	Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID)
4	6	<b>WX001</b>	20	21 день	Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID)

3) Ежедневное наблюдение за подопытными животными: Разработку и оценку данной методики и ее модификаций проводил и одобрял Комитет по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC). Использование и содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с нормами Международной ассоциации по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC). Здоровье и смертность животных отслеживали ежедневно. Рутинные

обследования включали наблюдение роста опухоли и оценку влияния введения лекарств на параметры поведения животных, такие как активность, потребление пищи и воды (только визуальная инспекция), изменение веса (измерение веса два раза в неделю), внешние проявления или другие нарушения. Гибель животных и побочные эффекты в каждой группе регистрировали относительно числа животных в каждой группе.

4) Препарат исследуемого соединения

a) Группа на носителе: 5% ДМСО + 95% (20% HP-β-CD).

b) Группа на исследуемом соединении: Нужное количество исследуемого соединения отвешивали во флаконе. Добавляли соответствующий объем ДМСО и затем смесь перемешивали на вихревой мешалке для получения прозрачного раствора. Добавляли нужный объем 20% HP-β-CD и затем смесь перемешивали на вихревой мешалке для получения гомогенной суспензии.

5) Измерение опухоли и индикаторов в данном исследовании:

a) Диаметр опухоли измеряли дважды в неделю с помощью штангенциркуля. Формула для вычисления объема опухоли:  $TV=1/2 \times a \times b^2$ , где a и b представляют собой большой и малый диаметры опухоли, соответственно;

b) Эффективность ингибирования роста опухоли соединением оценивали по показателю TGI (%). TGI (%) показывает степень ингибирования роста опухоли. TGI (%) вычисляли следующим образом:  $TGI (\%) = \{ [1 - (\text{средний объем опухоли в конце введения группе на препарате} - \text{средний объем опухоли в начале введения этой группе на препарате})] / (\text{средний объем опухоли в конце введения контрольной группе на растворителе} - \text{средний объем опухоли в начале введения контрольной группе на растворителе}) \} \times 100\%$ .

5. Результаты исследования:

1) Как показано в Таблице 8 и на Фиг. 1, в подкожной ксенотрансплантатной модели опухоли с клетками меланомы человека A375 у бестимусных мышей **WX001** ингибировал рост опухоли дозозависимым образом после перорального введения до Дня 21, в трех дозировках 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, и значение TGI составляло 36%, 81% и 104%, соответственно.

2) Вес тела подопытных животных использовали как справочный показатель для косвенной оценки токсичности лекарства. Как показано на Фиг. 2, при введении вплоть до Дня 21 вес тела всех животных в контрольной группе на растворителе и в группе на **WX001** существенно не снижался, и не наблюдалось болезненности или гибели.

Таблица 8: Результаты *in vivo* исследования эффективности в мышинной модели

A375

Лекарство	TGI
<b>WX001</b> (5 мг/кг, PO, BID)	36%
<b>WX001</b> (10 мг/кг, PO, BID)	81%
<b>WX001</b> (20 мг/кг, PO, BID)	104%

Вывод: **WX001** ингибирует рост опухоли дозозависимым образом в трех дозировках 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг; При введении вес тела животных существенно не снижался, и наблюдалась хорошая переносимость.

### Пример исследования 6. *In vivo* исследование фармакокинетики на крысах SD

#### 1. Цель исследования:

Самцы крыс линии SD использовались в качестве подопытных животных. После однократного введения измеряли концентрацию соединения в плазме крови и оценивали фармакокинетические параметры.

#### 2. Методика проведения исследования:

Отбирали шесть здоровых взрослых самцов крыс SD, из которых 3 крысы были в группе с внутривенным инъекционным введением и 3 крысы – в группе с пероральным введением. Носитель для группы с внутривенным инъекционным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с нужным количеством носителя для внутривенного введения, перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали в ультразвуковой бане для получения прозрачного раствора с концентрацией 0.2 мг/мл. Полученный прозрачный раствор фильтровали через микропористую мембрану, после этого он был готов к использованию. Носитель для группы с пероральным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с носителем, перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали в ультразвуковой бане для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл. Крысам SD вводили 1 мг/кг внутривенно или 10 мг/кг перорально, и затем отбирали образцы цельной крови в течение необходимого периода времени. Получали плазму крови. Определяли концентрацию лекарства методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA).

Примечание: ДМСО = диметилсульфоксид; HP-β-CD: гидроксипропил-β-циклодекстрин.

#### 3. Результаты исследования приведены в Таблице 9:

Таблица 9: Результаты исследования фармакокинетики соединения

Соединение	$C_{\text{макс}}$ (нМ)	F%	Перорально DNAUC (нМ.ч/ мг/кг)	$V_{d_{ss}}$ (л/кг)	Cl (мл/мин/кг)	$T_{1/2}$ (ч)
<b>WX001</b>	1011	21%	302.12	1.06	24.8	2.60

Примечание:  $C_{\text{макс}}$  = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC = AUC<sub>PO</sub>/Доза, AUC<sub>PO</sub> = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства;  $V_{d_{ss}}$  = объем распределения; Cl = скорость выведения; и  $T_{1/2}$  = время полужизни.

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует прекрасную концентрацию при пероральном введении и биодоступность.

### Пример исследования 7. *In vivo* исследование фармакокинетики на яванских макаках

#### 1. Цель исследования:

Самцы яванских макак использовались в качестве подопытных животных. После однократного введения измеряли концентрацию соединения в плазме крови и оценивали фармакокинетические параметры.

#### 2. Методика проведения исследования:

Отбирали пять здоровых взрослых самцов яванских макак, из которых 2 животных были в группе с внутривенным инъекционным введением и 3 животных – в группе с пероральным введением. Носитель для группы с внутривенным инъекционным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с нужным количеством носителя для внутривенного введения, перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали в ультразвуковой бане для получения прозрачного раствора с концентрацией 0.4 мг/мл. Полученный прозрачный раствор фильтровали через микропористую мембрану, после этого он был готов к использованию. Носитель для группы с пероральным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с носителем и растворяли при перемешивании для получения раствора с концентрацией 0.3 мг/мл. Яванским макакам вводили 1 мг/кг внутривенно или 3 мг/кг перорально, и затем отбирали образцы цельной крови в течение необходимого периода времени. Получали плазму крови. Определяли концентрацию лекарства методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA).

Примечание: ДМСО = диметилсульфоксид; HP-β-CD: гидроксипропил-β-

циклодекстрин.

3. Результаты исследования приведены в Таблице 10:

Таблица 10: Результаты исследования фармакокинетики соединения

Соединение	$C_{\text{макс}}$ (нМ)	F%	Перорально DNAUC (нМ.ч/ мг/кг)	$V_{dss}$ (л/кг)	Cl (мл/мин/кг)	$T_{1/2}$ (ч)
<b>WX001</b>	1248	41%	1995.93	1.19	7.90	2.0

Примечание:  $C_{\text{макс}}$  = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC =  $AUC_{\text{PO}}/\text{Доза}$ ,  $AUC_{\text{PO}}$  = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства;  $V_{dss}$  = объем распределения; Cl = скорость выведения; и  $T_{1/2}$  = время полужизни.

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует прекрасную концентрацию при пероральном введении и биодоступность.

### **Пример исследования 8. *In vivo* исследование фармакокинетики на собаках породы бигль**

1. Цель исследования:

Самцы собак породы бигль использовались в качестве подопытных животных. После однократного введения измеряли концентрацию соединения в плазме крови и оценивали фармакокинетические параметры.

2. Методика проведения исследования:

Отбирали пять здоровых взрослых самцов собак породы бигль, из которых 2 животных были в группе с внутривенным инъекционным введением и 3 животных – в группе с пероральным введением. Носитель для группы с внутривенным инъекционным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с нужным количеством носителя для внутривенного введения и растворяли при перемешивании для получения прозрачного раствора с концентрацией 0.4 мг/мл. Полученный прозрачный раствор фильтровали через микропористую мембрану, после этого он был готов к использованию. Носитель для группы с пероральным введением: 5% ДМСО+95% (20% HP-β-CD). Исследуемое соединение смешивали с носителем и растворяли при перемешивании для получения раствора с концентрацией 0.3 мг/мл. Яванским обезьянам вводили 1 мг/кг внутривенно или 3 мг/кг перорально, и затем отбирали образцы цельной крови в течение необходимого периода времени. Получали плазму крови. Определяли концентрацию лекарства методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight,

USA).

Примечание: ДМСО = диметилсульфоксид; HP- $\beta$ -CD: гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин.

3. Результаты исследования приведены в Таблице 11:

Таблица 11: Результаты исследования фармакокинетики соединения

Соединение	$C_{\text{макс}}$ (нМ)	F%	Перорально DNAUC (нМ.ч/ мг/кг)	$V_{d_{ss}}$ (л/кг)	Cl (мл/мин/кг)	$T_{1/2}$ (ч)
<b>WX001</b>	1229	52%	1099.27	1.94	19.0	1.09

Примечание:  $C_{\text{макс}}$  = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC = AUC<sub>PO</sub>/Доза, AUC<sub>PO</sub> = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства;  $V_{d_{ss}}$  = объем распределения; Cl = скорость выведения; и  $T_{1/2}$  = время полужизни.

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует прекрасную концентрацию при пероральном введении и биодоступность.

### Пример исследования 9. Исследование действия соединения на hERG

1. Цель исследования:

Использовали полностью автоматический пэтч-кламп метод для оценки влияния соединения на ток в калиевых каналах hERG (ген специфических калиевых каналов в сердце человека).

2. Методика проведения исследования:

#### 2.1 Препарат клеток

СНО-hERG клетки выращивали в культуральной колбе размером 175 см<sup>2</sup>. Когда клетки дорастали до плотности 60~80%, культуральную среду удаляли. Клетки промывали один раз 7 мл PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) и затем добавляли 3 мл Detachin для растворения. После окончания растворения добавляли 7 мл культуральной среды для нейтрализации и центрифугировали смесь. Отсасывали надосадочный раствор и затем добавляли 5 мл культуральной среды для ресуспендирования клеток с плотностью клеток 2~5×10<sup>6</sup>/мл.

#### 2.2 Приготовление раствора

Внеклеточный раствор (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES и 10 Глюкоза; препарат доводили до pH 7.4 с помощью NaOH.

Внутриклеточный раствор (мМ): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA и 10 HEPES; препарат доводили до pH 7.2 с помощью KOH.

### 2.3 Электрофизиологическая методика

Высокоимпедансное изолирование единичной клетки и формирование whole-cell модели проводили полностью автоматически на приборе Qpatch. После выхода на whole-cell режим регистрации, фиксировали клетки при  $-80$  мВ. На клетки последовательно подавали исходный потенциал  $-50$  мВ в течение 50 миллисекунд и деполяризующий потенциал  $+40$  мВ в течение 5 секунд, затем реполяризации при  $-50$  мВ 5 секунд и затем обратно к  $-80$  мВ. Это стимулирующее напряжение применяли каждые 15 секунд и производили регистрацию в течение 2 минут. Затем подавали внеклеточный раствор и производили регистрацию в течение 5 минут. Затем начинали процесс введения лекарства. Концентрация соединения стартовала с самой низшей тестируемой концентрации, и на каждую тестируемую концентрацию отводили 2.5 минуты. После последовательного использования всех тестируемых концентраций, вводили 3М Цисаприд (служит положительным контролем). По меньшей мере 3 клетки исследовали для каждой концентрации ( $n \geq 3$ ).

### 2.4 Препарат соединения

20.00 мМ стоковый раствор соединения разводили добавлением ДМСО. 10 мкл стокового раствора соединения добавляли в 20 мкл ДМСО и проводили серийные 3-кратные разведения с получением 6 концентраций в ДМСО. 4 мкл растворов соединения в 6 концентрациях в ДМСО добавляли соответственно в 396 мкл внеклеточного раствора, и проводили серийные 100-кратные разведения с получением 6 промежуточных концентраций. 80 мкл растворов соединения в 6 промежуточных концентрациях добавляли соответственно в 320 мкл внеклеточного раствора и проводили серийные 5-кратные разведения с получением финальных концентраций для исследования. Наивысшая из исследованных концентраций составляла 40 мкМ, и всего было 6 концентраций: 40, 13.3, 4.4, 1.48, 0.494 и 0.165 мкМ, соответственно. Содержание ДМСО в финальной концентрации для исследования не превышало 0.2%. Такая концентрация ДМСО не оказывает эффекта на hERG калиевые каналы. Все разведения препаратов соединения проводили с помощью прибора Bravo.

### 2.5 Анализ результатов

Анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 5.0.

### 2.6 Контроль качества

Условия среды: Влажность 20~50%, температура 22~25°C

Реагент: Реагенты для проведения исследования покупали в Sigma, их чистота составляла >98%.

Результаты исследования в отчете должны соответствовать следующим стандартам:

Изолирующий импеданс цельной клетки > 100 МОм

Амплитуда следового тока > 300 пкА

Фармакологические параметры:

Ингибирующее действие нескольких концентраций цисаприда на hERG каналы измеряли в качестве положительного контроля.

3. Полученные результаты исследования приведены в Таблице 12:

Таблица 12: Результат исследования действия соединения на hERG

Соединение	IC50 (мкМ)
<b>WX001</b>	> 40

Вывод: Соединение по настоящему изобретению оказывает слабое ингибирующее действие на ток в калиевых каналах hERG, что снижает риск кардиотоксичности и повышает безопасность использования.

### **Пример исследования 10. Исследование связывания с белками плазмы крови (РРВ)**

1. Цель исследования:

Определяли степень связывания исследуемого соединения с альбумином крови в плазме человека/мыши/крысы/собаки/обезьяны.

2. Методика проведения исследования:

1) Приготовление матрикса: в день проведения исследования размораживали плазму крови в холодной воде и центрифугировали при 3220 об/мин в течение 5 минут для удаления всех сгустков. Значение pH полученной плазмы крови измеряли и доводили до  $7.4 \pm 0.1$ , используя при необходимости 1% раствор фосфорной кислоты или 1н. раствор гидроксида натрия.

2) Методика разведения исследуемого соединения: исследуемое соединение растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), получая стоковые растворы с концентрациями 10 мМ и 2 мМ, соответственно. 40 мкМ рабочий раствор готовили, разбавляя 2 мкл стокового раствора (2 мМ) добавлением 98 мкл ДМСО. 400 мкМ рабочий раствор контрольного соединения готовили, разбавляя 10 мкл стокового раствора добавлением 240 мкл ДМСО. Рабочий раствор соединения (5 мкл) хорошо смешивали с бланковым матриксом (995 мкл) в соотношении 1:200, получая нагрузочный матрикс.

3) Стадии анализа:

а) 30 мкл нагрузочного матрикса (n=2) переносили в планшет для сбора образцов, получая образец Время 0 (T0) для остаточной оценки. В образец немедленно добавляли соответствующий бланковый буфер до финального объема 60 мкл, и



соотношение объемов плазмы и буфера в каждой лунке составляло 1:1. Затем добавляли 60 мкл 4%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в  $\text{H}_2\text{O}$  и 480 мкл останавливающего раствора, содержащего внутренний стандарт, к образцу Т0 исследуемого соединения. Их далее хранили с другими образцами при 2-8°C для дальнейшей обработки.

b) Оставшиеся образцы плазмы преинкубировали в инкубаторе с диоксидом углерода при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Образцы без белка (F образцы) и образцы с матриксом (230 мкл) все переносили в поликарбонатные пробирки ( $n = 2$ ) и подвергали ультрацентрифугированию при  $37^\circ\text{C}$  и 155000 g (35000 об/мин) в течение 4 часов.

c) Для приготовления Т образцов (тестовых образцов), образец с дополнительным содержанием матрикса переносили в отдельный 96-луночный планшет (планшет для инкубирования образцов) и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 4 часов.

d) После окончания центрифугирования, 30 мкл образцов без белка и 30 мкл Т образцов переносили из второго слоя супернатанта (под верхним слоем) в новый планшет для отбора образцов. Каждый образец смешивали с соответствующим бланковым буфером или матриксом до финального объема 60 мкл, при этом объемное соотношение матрикс:буфер составляло 1:1. Во все образцы добавляли 60 мкл 4%-ного водного раствора  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и 480 мкл останавливающего раствора (с внутренним стандартом). Полученную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут, и 100 мкл супернатанта из каждого образца анализировали методом LC-MS/MS.

3. Результаты исследования приведены в Таблице 13:

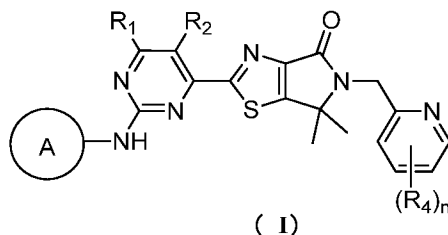
Таблица 13: Результаты исследования связывания соединения с белками плазмы крови

Соединение	Степень связывания с белками плазмы крови (% несвязанного)				
	Человек	Мышь	Крыса	Собака	Обезьяна
<b>WX001</b>	6.1%	7.2%	3.8%	4.1%	2.6%

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует связывание с белками плазмы крови от умеренного до сильного.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль,



где

$R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_a$ ;

каждый  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $C_{1-3}$  алкила, где  $C_{1-3}$  алкил обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_c$ ;

$n$  выбран из 1 и 2;

кольцо A выбрано из пиразолила и тетрагидропиранила, где пиразолил и тетрагидропиранил обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя  $R_d$ ;

$R_a$  и  $R_c$  каждый независимо выбраны из D, F, Cl, Br и I;

$R_d$  выбран из F, Cl, Br, I,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси, где  $C_{1-3}$  алкил и  $C_{1-3}$  алкокси обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R;

R выбран из F, Cl, Br и I.

2. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H,  $CH_3$  и  $CH_2CH_3$ , где  $CH_3$  и  $CH_2CH_3$  обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя  $R_a$ .

3. Соединение по п. 2 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_1$  и  $R_2$  каждый независимо выбраны из H,  $CH_3$ ,  $CHF_2$ ,  $CD_3$  и  $CH_2CH_3$ .

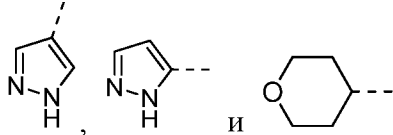
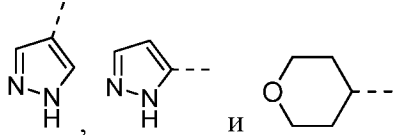
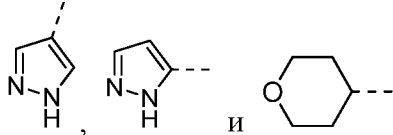
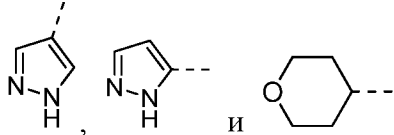
4. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $CH_3$ , где  $CH_3$  обязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя  $R_c$ .

5. Соединение по п. 4 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_4$  независимо выбран из H, F, Cl, Br, I и  $CH_3$ .

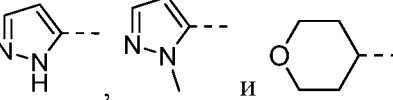
6. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_d$  выбран из F, Cl, Br, I,  $CH_3$  и  $OCH_3$ , где  $CH_3$  и  $OCH_3$  обязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R.

7. Соединение по п. 6 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R_d$  выбран из  $CH_3$  и  $OCH_3$ .

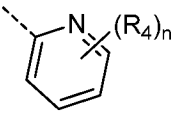
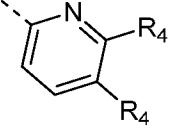
8. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо A

выбрано из , и  , где  и  необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R<sub>d</sub>.

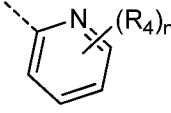
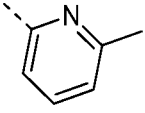
9. Соединение по п. 8 или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо А

выбрано из  .

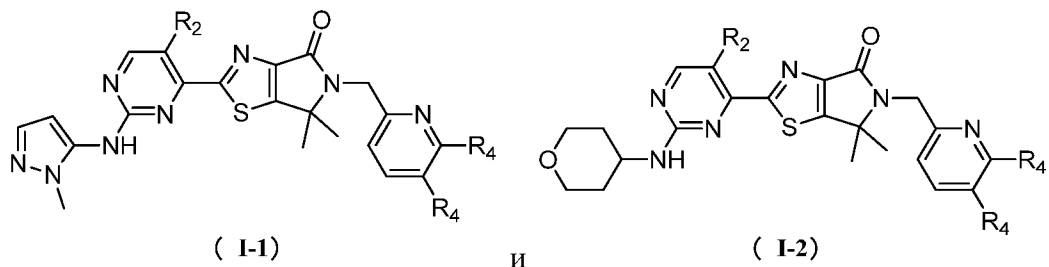
10. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где структурный

фрагмент  выбран из  .

11. Соединение по п. 10 или его фармацевтически приемлемая соль, где

структурный фрагмент  выбран из  .

12. Соединение по любому из пп. 1 - 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из

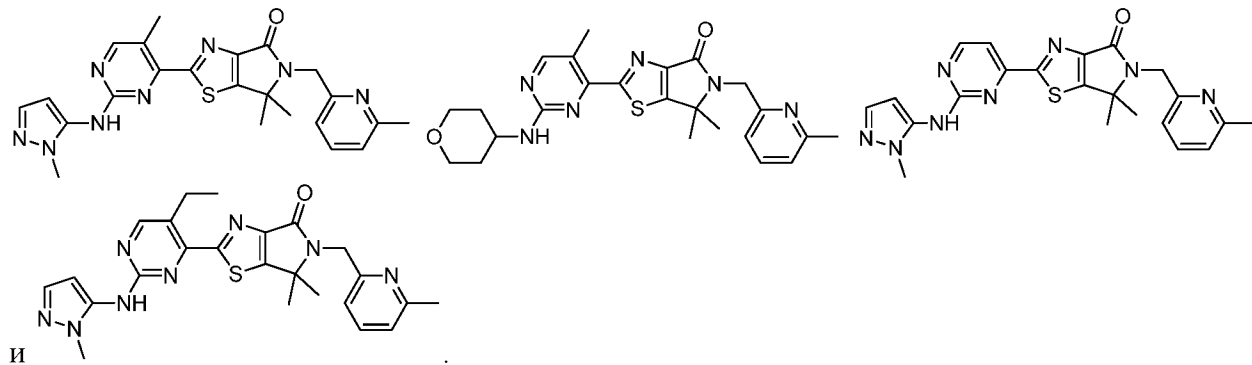


где

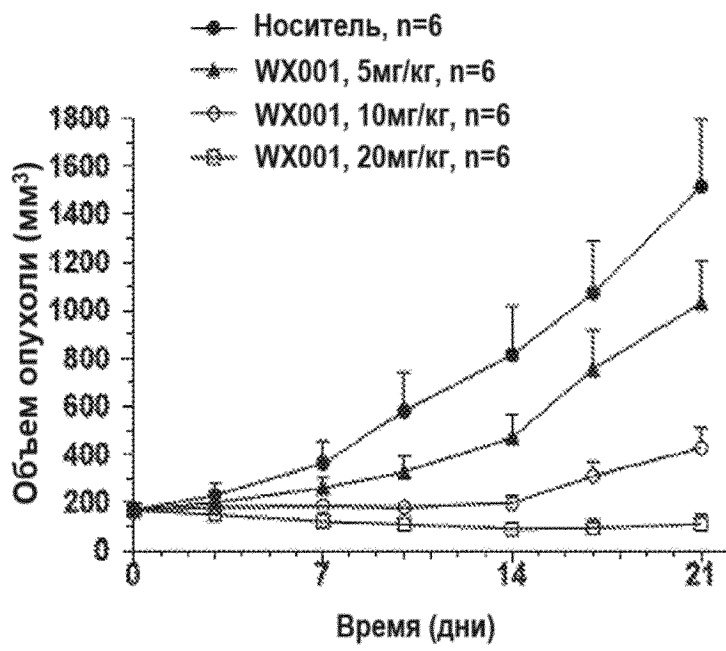
R<sub>2</sub> является таким как определено в любом из пп. 1 - 3;

R<sub>4</sub> является таким как определено в любом из пп. 1, 4 или 5.

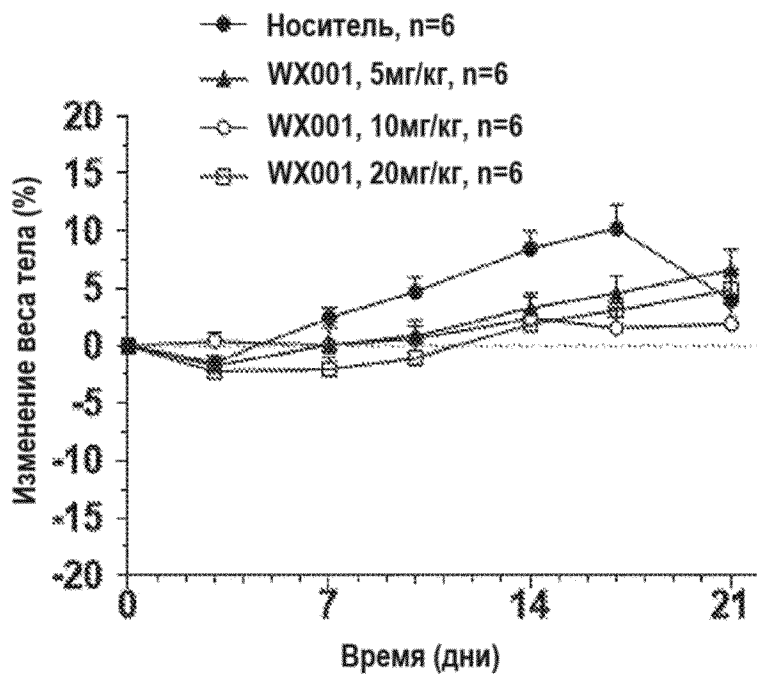
13. Соединение, выбранное из приведенных ниже соединений, или его фармацевтически приемлемая соль



14. Применение соединения по любому из пп. 1 - 13 или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения солидной опухоли.



ФИГ. 1



ФИГ. 2