

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393519 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.27

(22) Дата подачи заявки
2022.06.28

(51) Int. Cl. C07D 513/04 (2006.01)
A61K 31/429 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ТИАЗОЛОЛАКТАМНЫЕ СПИРОГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110722003.6; 202111673614.2;
202210693548.3

(32) 2021.06.28; 2021.12.31; 2022.06.17

(33) CN

(86) PCT/CN2022/102031

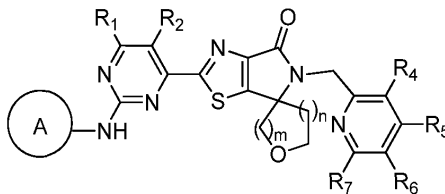
(87) WO 2023/274256 2023.01.05

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

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

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

(57) Описаны тиазололактамные спирогетероциклические соединения и их применение в получении лекарственного средства для лечения соответствующих заболеваний. Конкретнее, описано соединение формулы (I) и его фармацевтически приемлемые соли.



A1

202393519

202393519

A1

ТИАЗОЛОЛАКТАМНЫЕ СПИРОГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

В настоящей заявке истребуется приоритет, заявленный в заявках:

CN202110722003.6, подана 28 июня 2021г.;

CN202111673614.2, подана 31 декабря 2021г.;

CN202210693548.3, подана 17 июня 2022г.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается класса тиазололактамных спирогетероциклических 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.

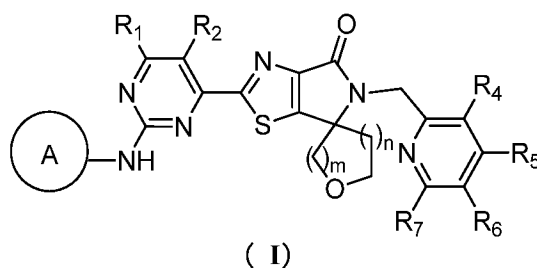
Внеклеточно регулируемые протеинкиназы (ERK) (в особенности ERK1 и ERK2 киназы) являются ключевыми участниками и нижележащими ключевыми узлами в Ras/Raf/MEK/ERK пути, и их сверхактивация наблюдается при многих видах рака

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 ;

R_4 , R_5 , R_6 , и R_7 каждый независимо выбраны 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 равен 0 или 1;

m равен 1 или 2;

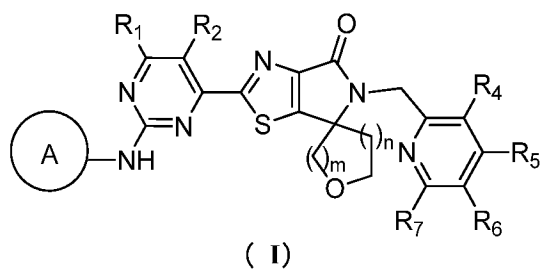
кольцо A выбрано из пирролила и тетрагидропиранила, где пирролил и тетрагидропиранил необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R_d ;

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 необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя R_a ;

R_4 , R_5 , R_6 и R_7 каждый независимо выбраны 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 равен 0 или 1;

m равен 1 или 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 и Br.

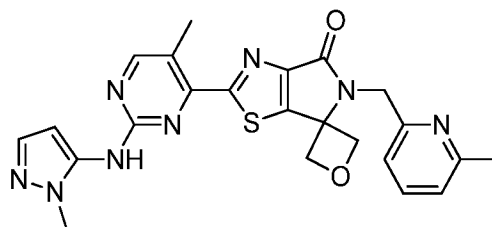
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше R_1 и R_2 каждый независимо выбраны из H, CH_3 и CH_2CH_3 , где CH_3 и CH_2CH_3 необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R_a , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

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 , R_5 , R_6 , и R_7 каждый независимо выбраны из H, F, Cl, Br, I и CH_3 , где CH_3 необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя R_c , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

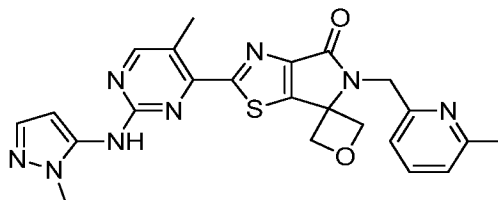
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше R_4 , R_5 , R_6 , и R_7 каждый независимо выбраны из H, F, Cl, Br, I и CH_3 , и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.

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 необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R, и остальные переменные имеют указанные в настоящем тексте значения.



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

В настоящем изобретении описана кристаллическая форма А соединения WX001, которая характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : $10.2080 \pm 0.2000^\circ$, $18.8429 \pm 0.2000^\circ$, $20.6217 \pm 0.2000^\circ$;



WX001

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А, выраженная в углах 2θ , содержит по меньшей мере 4 или 5 дифракционных пиков, выбранных из: $10.2080 \pm 0.2000^\circ$, $18.8429 \pm 0.2000^\circ$, $20.6217 \pm 0.2000^\circ$, $25.0767 \pm 0.2000^\circ$ и $25.4797 \pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : $10.2080 \pm 0.2000^\circ$, $18.8429 \pm 0.2000^\circ$, $20.6217 \pm 0.2000^\circ$, $25.0767 \pm 0.2000^\circ$, $25.4797 \pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А, выраженная в углах 2θ , содержит по меньшей мере 6, 7 или 8 дифракционных пиков, выбранных из: $10.2080 \pm 0.2000^\circ$, $15.2687 \pm 0.2000^\circ$, $17.6747 \pm 0.2000^\circ$, $18.8429 \pm 0.2000^\circ$, $20.6217 \pm 0.2000^\circ$, $21.0531 \pm 0.2000^\circ$, $25.0767 \pm 0.2000^\circ$ и $25.4797 \pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : $10.2080 \pm 0.2000^\circ$, $15.2687 \pm 0.2000^\circ$, $17.6747 \pm 0.2000^\circ$, $18.8429 \pm 0.2000^\circ$, $20.6217 \pm 0.2000^\circ$, $21.0531 \pm 0.2000^\circ$, $25.0767 \pm 0.2000^\circ$, $25.4797 \pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А, выраженная в углах 2θ , содержит по меньшей мере 9, 10, 11 или 12 дифракционных пиков, выбранных из: $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $14.4684\pm 0.2000^\circ$, $15.2687\pm 0.2000^\circ$, $17.6747\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, $20.6217\pm 0.2000^\circ$, $21.0531\pm 0.2000^\circ$, $21.5713\pm 0.2000^\circ$, $22.0420\pm 0.2000^\circ$, $22.4540\pm 0.2000^\circ$, $25.0767\pm 0.2000^\circ$ и $25.4797\pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $14.4684\pm 0.2000^\circ$, $15.2687\pm 0.2000^\circ$, $17.6747\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, $20.6217\pm 0.2000^\circ$, $21.0531\pm 0.2000^\circ$, $21.5713\pm 0.2000^\circ$, $22.0420\pm 0.2000^\circ$, $22.4540\pm 0.2000^\circ$, $25.0767\pm 0.2000^\circ$, $25.4797\pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, и/или $20.6217\pm 0.2000^\circ$, и/или $9.4003\pm 0.2000^\circ$, и/или $10.4856\pm 0.2000^\circ$, и/или $14.4684\pm 0.2000^\circ$, и/или $15.0133\pm 0.2000^\circ$, и/или $15.2687\pm 0.2000^\circ$, и/или $15.6003\pm 0.2000^\circ$, и/или $15.9518\pm 0.2000^\circ$, и/или $16.6214\pm 0.2000^\circ$, и/или $17.6747\pm 0.2000^\circ$, и/или $17.9514\pm 0.2000^\circ$, и/или $18.4703\pm 0.2000^\circ$, и/или $19.1531\pm 0.2000^\circ$, и/или $19.6571\pm 0.2000^\circ$, и/или $21.0531\pm 0.2000^\circ$, и/или $21.2894\pm 0.2000^\circ$, и/или $21.5713\pm 0.2000^\circ$, и/или $22.0420\pm 0.2000^\circ$, и/или $22.4540\pm 0.2000^\circ$, и/или $23.1098\pm 0.2000^\circ$, и/или $24.5027\pm 0.2000^\circ$, и/или $25.0767\pm 0.2000^\circ$, и/или $25.4797\pm 0.2000^\circ$, и/или $25.8919\pm 0.2000^\circ$, и/или $26.3255\pm 0.2000^\circ$, и/или $26.9544\pm 0.2000^\circ$, и/или $28.3997\pm 0.2000^\circ$, и/или $29.0345\pm 0.2000^\circ$, и/или $29.3507\pm 0.2000^\circ$, и/или $33.5390\pm 0.2000^\circ$, и/или $34.2457\pm 0.2000^\circ$, и/или $37.9776\pm 0.2000^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, порошковая рентгеновская дифрактограмма указанной выше кристаллической формы А содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ : 10.2080° , 10.4856° , 14.4684° , 15.0133° , 15.2687° , 15.9518° , 16.6214° , 17.6747° , 17.9514° , 18.4703° , 18.8429° , 19.1531° , 20.6217° , 21.0531° , 21.2894° , 21.5713° , 22.0420° , 22.4540° , 25.0767° , 25.4797° , 26.3255° , 26.9544° .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, XRPD диаграмма указанной выше кристаллической формы А в целом такая, как показано на Фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, данные анализа XRPD диаграммы указанной выше кристаллической формы А такие как показано в

Таблице 1:

Таблица 1. Данные анализа XRPD диаграммы кристаллической формы А соединения WX001

| № | 2θ угол (°) | D-расстояние (Å) | Отн. интенсивность (%) | № | 2θ угол (°) | D-расстояние (Å) | Отн. интенсивность (%) |
|----|-------------|------------------|------------------------|----|-------------|------------------|------------------------|
| 1 | 9.4003 | 9.41 | 4.31 | 18 | 21.2894 | 4.17 | 12.24 |
| 2 | 10.2080 | 8.67 | 100.00 | 19 | 21.5713 | 4.12 | 16.68 |
| 3 | 10.4856 | 8.44 | 18.12 | 20 | 22.0420 | 4.03 | 18.34 |
| 4 | 14.4684 | 6.12 | 12.63 | 21 | 22.4540 | 3.96 | 15.00 |
| 5 | 15.0133 | 5.90 | 18.36 | 22 | 23.1098 | 3.85 | 2.96 |
| 6 | 15.2687 | 5.80 | 19.23 | 23 | 24.5027 | 3.63 | 4.08 |
| 7 | 15.6003 | 5.68 | 7.48 | 24 | 25.0767 | 3.55 | 37.76 |
| 8 | 15.9518 | 5.56 | 11.70 | 25 | 25.4797 | 3.50 | 23.82 |
| 9 | 16.6214 | 5.33 | 11.12 | 26 | 25.8919 | 3.44 | 9.21 |
| 10 | 17.6747 | 5.02 | 19.86 | 27 | 26.3255 | 3.39 | 12.81 |
| 11 | 17.9514 | 4.94 | 10.14 | 28 | 26.9544 | 3.31 | 7.34 |
| 12 | 18.4703 | 4.80 | 10.70 | 29 | 28.3997 | 3.14 | 5.21 |
| 13 | 18.8429 | 4.71 | 56.52 | 30 | 29.0345 | 3.08 | 7.36 |
| 14 | 19.1531 | 4.63 | 10.90 | 31 | 29.3507 | 3.04 | 4.04 |
| 15 | 19.6571 | 4.52 | 8.63 | 32 | 33.5390 | 2.67 | 3.43 |
| 16 | 20.6217 | 4.31 | 41.16 | 33 | 34.2457 | 2.62 | 7.39 |
| 17 | 21.0531 | 4.22 | 18.31 | 34 | 37.9776 | 2.37 | 2.33 |

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, указанная выше кристаллическая форма А имеет кривую дифференциальной сканирующей калориметрии с началом эндотермического пика при $241.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, кривая ДСК указанной выше кристаллической формы А такая как изображена на Фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутая выше кристаллическая форма А имеет кривую термогравиметрического анализа с потерей веса до 0.83% при $150.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, кривая ТГА указанной выше кристаллической формы А такая как изображена на Фиг. 3.

В настоящем изобретении описано также применение указанной выше

кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения солидной опухоли.

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.

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 ее) 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 (^3H), иод-125 (^{125}I) или С-14(^{14}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 $-(\text{CRR})_0-$, это означает, что линкерная группа представляет собой простую связь.

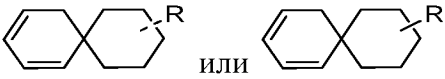
Когда число заместителей равно 0, это означает что заместителя нет. Например, $-\text{A}-(\text{R})_0$ означает, что структура на самом деле представляет собой $-\text{A}$.

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 А.

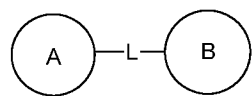
Когда одна из переменных представляет собой простую связь, это означает, что две группы, соединенные простой связью, соединены между собой напрямую. Например, когда L в A-L-Z представляет собой простую связь, структура A-L-Z в действительности представляет собой A-Z.

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

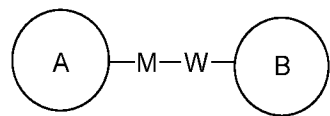
структурный фрагмент  означает, что заместитель R в нем

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.

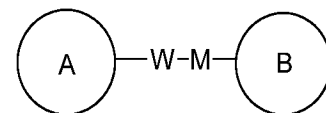
Когда для линкерной группы не указано направление связывания, значит направление связывания является произвольным. Например, когда линкерная группа L в



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




, или этот фрагмент может быть связан с кольцом А и кольцом В в

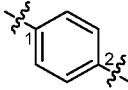


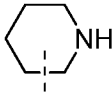
порядке, обратном прочтению слева направо, давая фрагмент

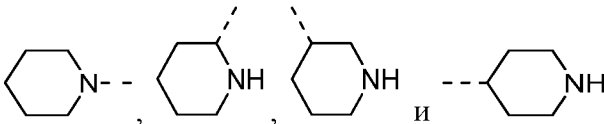
Комбинация линкерных групп, заместителей и/или их вариантов допустима только тогда, когда такая комбинация приводит к устойчивому соединению.

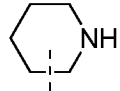
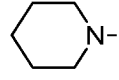
Если не указано иное, когда группа имеет один или больше сайтов связывания, любые один или больше сайтов в этой группе могут быть соединены с другими группами посредством химических связей. Когда положение присоединения химической связи переменное, и есть атом(ы) Н у сайтов присоединения, то если с химической 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 (—), прямой пунктирной линии (---) или волнистой линии (~~~~). Например, прямая сплошная линия

в $-OCH_3$ показывает, что данная группа соединена с остальными группами через атом кислорода в этой группе; прямая пунктирная линия в  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:  ; 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 "C₁₋₃ алкил" означает линейную или разветвленную насыщенную углеводородную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода. C₁₋₃ алкильная группа включает C₁₋₂ алкильную, C₂₋₃ алкильную группу и т.д. Она может быть одновалентной (например, метил), двухвалентной (например, метилен) или многовалентной (например, метенил). Примеры C₁₋₃ алкильных групп включают (но не ограничиваются только ими) метил (Me), этил (Et), пропил (включая n-пропил и изопропил) и т.п.

Если не указано иное, термин "C₁₋₃ алкокси" означает алкильную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода и присоединенную к остальной части молекулы через атом кислорода. C₁₋₃ алкокси-группа включает C₁₋₂, C₂₋₃, C₃ и C₂ алкокси-группы, и т.п. Примеры C₁₋₃ алкокси-групп включают (но не ограничиваются только ими) метокси, этокси, пропокси (включая n-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.

В настоящей спецификации упоминание "варианта осуществления" или "вариантов осуществления", или фраза "в другом варианте осуществления" или "в некоторых вариантах осуществления" означает, что определенный элемент, структура или характеристика, описанные в связке с этим вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления. Соответственно, выражения "в одном варианте осуществления" или "в другом варианте осуществления" или "в некоторых вариантах осуществления", появляющиеся в разных местах в настоящей спецификации, необязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретный элемент, структура или характеристика могут быть скомбинированы любым подходящим образом с одним или больше вариантами осуществления.

В контексте настоящего изобретения Exo Up в кривой ДСК означает восходящую экзотерму.

Структуру соединений по настоящему изобретению можно подтвердить общепринятыми методами, хорошо известными квалифицированным специалистам в данной области. Если в настоящей заявке обсуждается абсолютная конфигурация соединения, то абсолютная конфигурация может быть подтверждена известными методами, такими как рентгеноструктурный анализ монокристаллов (SXRД). При исследовании методом рентгеноструктурного анализа монокристаллов (SXRД) регистрируют интенсивность дифракции на выращенном монокристалле с помощью дифрактометра Bruker D8 venture, оснащенного источником CuK α излучения в режиме сканирования ϕ/ω ; после регистрации данных проводят анализ кристаллической структуры прямым методом (Shelxs97) для установления абсолютной конфигурации.

Настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью приведенных ниже примеров. Эти примеры никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Все растворители, применяющиеся в настоящем изобретении, коммерчески доступны и могут использоваться без дополнительной очистки.

Растворители, использующиеся 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; Boc означает трет-бутоксикарбонил, который является защитной группой для амина; r.t. означает комнатную температуру; ТГФ означает тетрагидрофуран; Boc₂O 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.

Метод порошковой рентгеновской дифракции (XRPD), использующийся в настоящем изобретении

Модель прибора: Рентгеновский дифрактометр X'Pert³ производства PANalytical

Методика анализа: Использовали примерно 10 мг образца для исследования методом XRPD.

Таблица 1. Параметры исследования методом XRPD

| Параметры | Установки |
|--------------------------------|---|
| Модель | X'Pert ³ |
| Рентгеновской излучение | Cu, α , $K\alpha_1$ (Å): 1.540598; $K\alpha_2$ (Å): 1.544426; $K\alpha_2/K\alpha_1$: 0.50 |
| Параметры рентгеновской трубки | 45 кВ, 40 мА |
| Щель расходимости | 1/8° |
| Режим сканирования | Непрерывный |
| Диапазон сканирования (°2Тета) | 3~40 |
| Время стадии сканирования (с) | 46.7 |
| Размер стадии (°2Theta) | 0.0263 |
| Время анализа (мин) | Около 5 минут |

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), использующийся в настоящем изобретении

Модель прибора: дифференциальный сканирующий калориметр TA 2500

Таблица 3. Параметры прибора и метода, использующиеся для ДСК анализа

| Параметры | Установки |
|--------------------|--|
| Метод | Линейный нагрев |
| Ячейка для образца | Алюминиевая ячейка, загнутые края/открытая |

| Параметры | Установки |
|--------------------------------|--|
| Диапазон температур | От 25°C до заданной конечной температуры |
| Скорость сканирования (°C/мин) | 10 |
| Инертный газ | N ₂ |

Метод термогравиметрического анализа (ТГА), использующийся в настоящем изобретении

Модель прибора: Анализатор для термогравиметрического анализа TA 5500

Таблица 4. Параметры прибора и метода, использующиеся для ТГА анализа

| Параметры | Установки |
|--------------------------------|---|
| Метод | Линейный нагрев |
| Ячейка для образца | Алюминиевая ячейка, открытая |
| Диапазон температур | От комнатной температуры до заданной конечной температуры |
| Скорость сканирования (°C/мин) | 10 |
| Инертный газ | N ₂ |

Метод динамической сорбции паров (ДСП), использующийся в настоящем изобретении

Кривые ДСП (метод динамической сорбции паров) получали на приборе DVS Intrinsic plus производства компании Surface Measurement Systems (SMS). Относительная влажность при 25 °C была скорректирована по точкам гигроскопичности LiCl, Mg(NO₃)₂ и KCl.

Таблица 5. Параметры тестирования методом ДСП

| Параметры | Установки |
|---|---|
| Температура | 25°C |
| Количество образца | 10-20 мг |
| Инертный газ и скорость потока | N ₂ , 200 мл/мин |
| dm/dt | 0.002 %/мин |
| Минимальное время баланса dm/dt | 10 мин |
| Максимальное время баланса | 180 мин |
| Тестируемый диапазон относительной влажности (RH) | 0%RH-95%RH |
| Градиент относительно влажности | 10% (0%RH-90%RH, 90%RH-0%RH) 5% (90%RH-95%RH, 95%RH-90%RH) |

Таблица 6. Классификация гигроскопичности

| Классификация гигроскопичности | $\Delta W\%$ |
|---|---|
| Расплывающееся | Адсорбирует воду в количестве, достаточном для образования жидкости |
| Очень гигроскопично | $\Delta W\% \geq 15\%$ |
| Гигроскопично | $15\% > \Delta W\% \geq 2\%$ |
| Малогигроскопично | $2\% > \Delta W\% \geq 0.2\%$ |
| Негигроскопично или почти негигроскопично | $\Delta W\% < 0.2\%$ |

Примечание: $\Delta W\%$ представляет собой увеличение веса тестируемого образца при поглощении влаги при 25 ± 1 °C и $80 \pm 2\%$ RH.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: XRPD диаграмма кристаллической формы А соединения WX001 с использованием Cu-K α излучения;

Фиг. 2: ДСК кривая кристаллической формы А соединения WX001;

Фиг. 3: ТГА кривая кристаллической формы А соединения WX001;

Фиг. 4: Диаграмма ДСП кристаллической формы А соединения WX001;

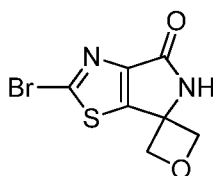
Фиг. 5: Кривые роста опухоли меланомы человека A375 в животной модели после введения растворителя и WX001;

Фиг. 6: Скорость изменения веса у модельных животных с меланомой человека A375 при введении растворителя и WX001.

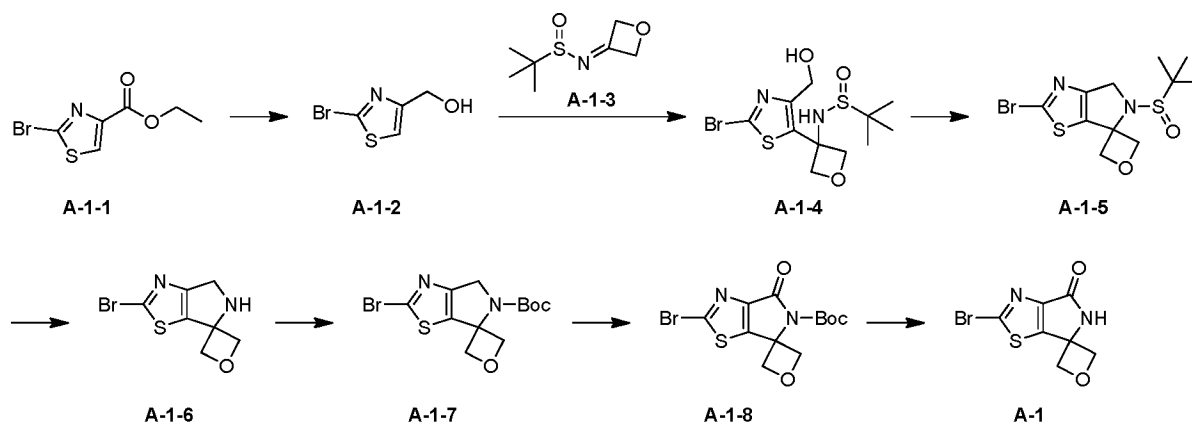
Подробное описание изобретения

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



A-1



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

В реакционную колбу помещали **A-1-1** (150 г, 635.36 ммоль, 1 экв.), хлорид кальция (70.51 г, 635.36 ммоль, 1 экв.), тетрагидрофуран (500 мл) и этанол (1000 мл). Боргидрид натрия (48.07 г, 1.27 моль, 2 экв.) добавляли в атмосфере азота, и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 15 часов. После окончания реакции реакционный раствор упаривали при пониженном давлении. Остаток от упаривания разводили 15%-ным водным раствором лимонной кислоты (4000 мл) и экстрагировали этилацетатом (4000 мл x 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2000 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая **A-1-2**. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ (м.д.) = 7.47 (с, 1H), 5.58 (ушир.с, 1H), 4.52 (с, 2H).

Стадия 2: Синтез соединения **A-1-4**.

В реакционную колбу помещали **A-1-2** (102 г, 525.64 ммоль, 1 экв.) и 2-метилтетрагидрофуран (1000 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до -70°C и медленно добавляли по каплям диизопропиламид лития (2 М, 525.64 мл, 2.0 экв.). Полученную смесь перемешивали при -70°C в течение 30 минут. Затем медленно добавляли по каплям раствор **A-1-3** (138.18 г, 788.46 ммоль, 1.5 экв.) в 2-метилтетрагидрофуране (400 мл), и реакционную смесь перемешивали при -70°C еще 1 час. После окончания реакции гасили реакцию насыщенным водным раствором хлорида аммония (2000 мл) и экстрагировали этилацетатом (2000 мл x 4). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (1000 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт сначала очищали на колонке, а затем очищали путем суспендирования в метил-трет-бутиловом эфире, получая **A-1-4**. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ (м.д.) = 6.41 (с, 1H), 5.43 (т, *J* = 5.6 Гц, 1H), 5.00 - 4.84 (м, 4H), 4.38 (д, *J* = 5.6

Гц, 2H), 1.12 (с, 9H).

Стадия 3: Синтез соединения **A-1-5**.

В реакционную колбу помещали **A-1-4** (50 г, 135.39 ммоль, 1 экв.), дипепириид азодикарбоновой кислоты (40.99 г, 162.47 ммоль, 1.2 экв.) и тетрагидрофуран (500 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 0°C и медленно добавляли по каплям раствор трибутилфосфина (32.87 г, 162.47 ммоль, 40.09 мл, 1.2 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. После окончания реакции последовательно добавляли в реакционный раствор воду (500 мл) и насыщенный раствор хлорида натрия (500 мл). Полученную смесь экстрагировали этилацетатом (500 мл x 2). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении досуха, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт суспендировали в 500 мл метил-трет-бутилового эфира и фильтровали. Фильтрат собирали и упаривали, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт суспендировали в 50 мл н-гексана и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **A-1-5**. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ (м.д.) = 5.29 (д, *J* = 7.5 Гц, 1H), 4.88 - 4.75 (м, 3H), 4.60 (д, *J* = 12.9 Гц, 1H), 4.22 (д, *J* = 12.9 Гц, 1H), 1.26 (с, 9H).

Стадия 4: Синтез соединения **A-1-6**.

В реакционную колбу помещали **A-1-5** (29 г, 82.55 ммоль, 1 экв.), тетрагидрофуран (250 мл) и воду (50 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли иод (2.10 г, 8.26 ммоль, 1.66 мл, 0.1 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 18 часов. Затем добавляли дополнительное количество иода (2.10 г, 8.26 ммоль, 1.66 мл, 0.1 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 50°C еще 6 часов. После окончания реакции получали раствор сырого **A-1-6** и использовали его в следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 5: Синтез соединения **A-1-7**.

В раствор, содержащий сырой **A-1-6**, добавляли карбонат натрия (17.50 г, 165.11 ммоль, 2 экв.). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли ди-трет-бутил карбонат (27.03 г, 123.83 ммоль, 28.45 мл, 1.5 экв.). Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов. После окончания реакции реакционный раствор выливали в воду (200 мл) и затем экстрагировали этилацетатом (300 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (300 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали

методом колоночной хроматографии, получая **A-1-7**. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ (м.д.) = 5.46 (д, $J = 5.9$ Гц, 1H), 5.32 (д, $J = 6.3$ Гц, 1H), 4.64 (д, $J = 6.1$ Гц, 1H), 4.55 (д, $J = 5.8$ Гц, 1H), 4.49 (д, $J = 9.4$ Гц, 2H), 1.53 (с, 9H).

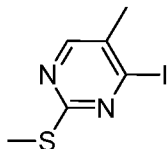
Стадия 6: Синтез соединения **A-1-8**.

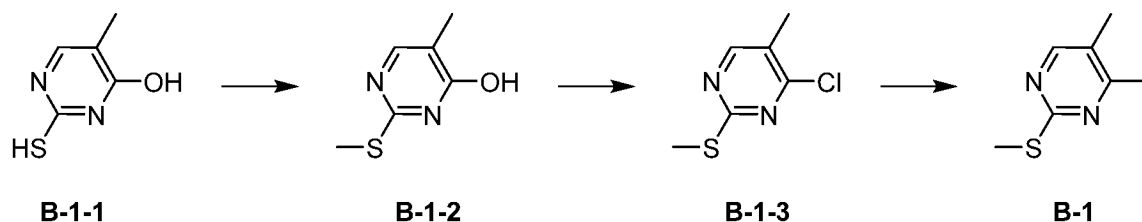
В реакционную колбу помещали **A-1-7** (26.5 г, 76.32 ммоль, 1 экв.), ледяную уксусную кислоту (1.37 г, 22.90 ммоль, 1.31 мл, 0.3 экв.) и ацетонитрил (260 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь нагревали до 50°C , и добавляли по каплям раствор хлорита натрия (32.48 г, 305.28 ммоль, 85% чистота, 4 экв.) в воде (70 мл). После окончания добавления реакционную смесь перемешивали при 50°C еще 12 часов. Затем добавляли дополнительное количество хлорита натрия (8.97 г, 99.21 ммоль, 1.3 экв.) и ледяной уксусной кислоты (458.31 мг, 7.63 ммоль, 436.49 мкл, 0.1 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 50°C еще 6 часов. После окончания реакции гасили реакцию насыщенным водным раствором сульфита натрия (150 мл) и добавляли воду (90 мл). Полученную смесь оставляли отстаиваться и отделяли органическую фазу. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (90 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия (90 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт суспендировали при перемешивании в смеси этилацетат:н-гексан (1:5, 120 мл) и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **A-1-8**. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.) = 5.61 (д, $J = 6.6$ Гц, 2H), 4.76 (д, $J = 6.6$ Гц, 2H), 1.66 (с, 9H).

Стадия 7: Синтез соединения **A-1**.

В высушенную реакционную колбу помещали **A-1-8** (10 г, 27.68 ммоль, 1 экв.) и дихлорметан (100 мл). Трифторуксусную кислоту (41.04 г, 359.90 ммоль, 26.65 мл, 13 экв.) добавляли при 0°C . Полученную смесь перемешивали при 0°C 0.5 часа. После окончания реакции реакционный раствор медленно выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (1000 мл) и доводили pH до 7–8. Полученную смесь экстрагировали дихлорметаном (1000 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая **A-1**. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ (м.д.) = 9.59 (с, 1H), 4.99–4.78 (м, 4H).

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.), ледяную 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 с фильтра. Полученную смесь перемешивали 0.5 часа и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили в термошкафу, получая **B-1-2**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ (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**.

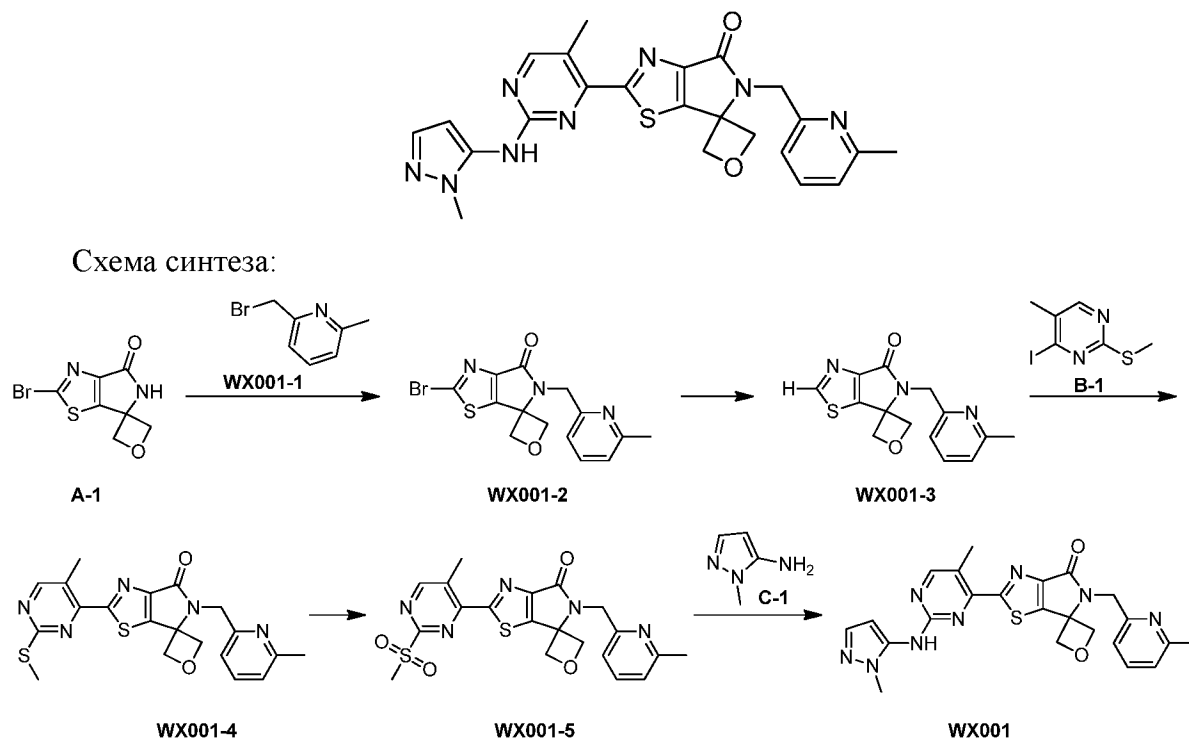
В реакционную колбу помещали ацетонитрил (15 л) и **B-1-2** (1500.00 г, 9.60 моль, 1 экв.) при 25°C. Затем добавляли оксихлорид фосфора (1840.00 г, 12.0 моль, 1.25 экв.). Полученную смесь медленно нагревали до 62°C и перемешивали при 62°C в течение 12 часов. Реакционный раствор выливали в воду (10.5 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**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ (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, 24.76 мл, 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 (1200 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 реакционную смесь перемешивали 1 час. Полученную смесь фильтровали и собирали осадок на фильтре, получая **B-1**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.) = 8.34 (с, 1H), 2.48 (с, 3H), 2.21 (с, 3H).

Пример 1



Стадия 1: Синтез **WX001-2**

В реакционную колбу помещали **A-1** (500 мг, 1.92 ммоль, 1 экв.), **WX001-1** (427.54 мг, 2.30 ммоль, 1.2 экв.) и *N,N*-диметилформаид (3 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Карбонат цезия (935.92 мг, 2.87 ммоль, 1.5 экв.) добавляли, и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. После окончания реакции реакционный раствор выливали в воду (20 мл) и экстрагировали реакционную смесь этилацетатом (30 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем, получая **WX001-2**. LCMS (m/z): 366, 368 [M + H]⁺.

Стадия 2: Синтез **WX001-3**

В предварительно высушенной реакционной колбе заменяли атмосферу в реакционной колбе азотом и добавляли влажный палладий на угле (0.1 г, 819.15 мкмоль, 10% чистота, 1 экв.) и этанол (20 мл). Затем добавляли **WX001-2** (300 мг, 819.15 мкмоль, 1

экв.). Атмосферу в реакционной колбе трижды заменяли на азот, реакционную смесь перемешивали при 50°C и 50 фунт/кв.дюйм в течение 24 часов. После окончания реакции реакционный раствор фильтровали, и фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем, получая **WX001-3**. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ (м.д.) = 8.96 (с, 1H), 7.58 (т, J = 7.6 Гц, 1H), 7.19 (д, J = 7.6 Гц, 1H), 7.09 (д, J = 7.5 Гц, 1H), 5.26 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 5.14 (с, 2H), 4.80 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 2.55 (с, 3H).

Стадия 3: Синтез **WX001-4**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-3** (60 мг, 208.81 мкмоль, 1 экв.), тетрагидрофуран (1 мл) и раствор хлорида цинка (0.7 М, 298.31 мкл, 1 экв.). Полученную смесь охлаждали до -78°C и добавляли гексаметилдисилазид лития (1 М, 417.63 мкл, 2 экв.). Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 часа, получая реакционный раствор 1.

Смесь **B-1** (55.57 мг, 208.81 мкмоль, 1 экв.) и тетракис(трифенилфосфин)палладия (7.24 мг, 6.26 мкмоль, 0.03 экв.) в *N,N*-диметилацетамиде (1 мл) нагревали до 50°C в атмосфере азота, и затем добавляли по каплям реакционный раствор 1. После окончания добавления реакционную смесь перемешивали при 50°C еще 1 час. После окончания реакции реакционный раствор выливали в воду (5 мл) и затем экстрагировали дихлорметаном (30 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем, получая **WX001-4**. LCMS (m/z): 426.0 [M + H]⁺.

Стадия 4: Синтез **WX001-5**

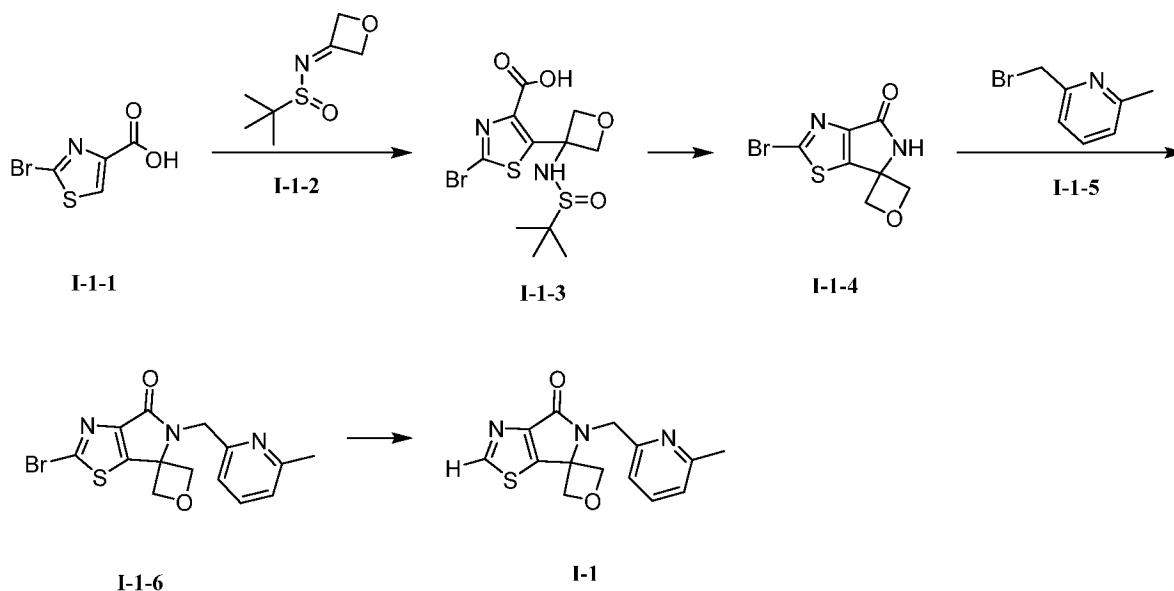
В реакционную колбу помещали **WX001-4** (100 мг, 235.00 мкмоль, 1 экв.), ацетонитрил (1 мл) и воду (0.5 мл). Атмосферу в реакционной колбе три раза заменяли азотом и добавляли моноперсульфат калия (288.95 мг, 470.01 мкмоль, 2 экв.). Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 14 часов. После окончания реакции реакционный раствор выливали в насыщенный водный раствор тиосульфата натрия (5 мл), и реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (30 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали последовательно насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (20 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силикагелем, получая **WX001-5**.

LCMS (m/z): 458.0 [M + H]⁺.

Стадия 5: Синтез **WX001**

В высушенную реакционную колбу помещали **WX001-5** (40 мг, 87.43 мкмоль, 1 экв.), **C-1** (16.98 мг, 174.85 мкмоль, 2 экв.) и тетрагидрофуран (0.5 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 0°C и добавляли по каплям гексаметилдисилазид лития (1 М, 166.11 мкл, 1.9 экв.). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. После окончания реакции реакционный раствор выливали в воду (5 мл), и реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (30 мл x 3). Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Waters Xbridge ВЕН C18 100*25мм*5мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ бикарбонат аммония)-ацетонитрил]; В (ацетонитрил) %: 20%-50%, 10 мин), получая **WX001**. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ = 9.67 (ушир.с, 1Н), 8.62 (с, 1Н), 7.64 (т, J = 7.7 Гц, 1Н), 7.43 (д, J = 1.8 Гц, 1Н), 7.14 (дд, J = 2.9, 7.7 Гц, 2Н), 6.37 (д, J = 1.5 Гц, 1Н), 5.12 (д, J = 7.2 Гц, 2Н), 5.02 (с, 2Н), 4.85 (д, J = 7.2 Гц, 2Н), 3.74 (с, 3Н), 2.57 (с, 3Н), 2.42 (с, 3Н); LCMS (m/z): 475.0 [M + H]⁺.

Пример 2: Получение кристаллической формы А соединения **WX001**



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

Тetraгидрофуран (12 л) и **I-1-1** (1200 г, 5.69 моль) помещали в реакционную колбу. Медленно добавляли в реакционную колбу тетраметилэтилендиамин (661.59 г, 5.69 моль). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до -70°C (внутренняя температура). Медленно добавляли по каплям диизопропиламид лития (2 М,

6.83 л), и реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 0.5 часа. Раствор **I-1-2** (1.76 кг, 9.39 моль) в тетрагидрофуране (4.8 л) медленно добавляли по каплям (1.5 часа), и реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 1 часа. После окончания реакции в реакционный раствор добавляли по каплям воду (6 л). Реакционную колбу промывали водой (2.4 л). Полученную смесь объединяли и перемешивали. Полученную смесь нагревали до 10°C . Слои разделяли, и водную фазу экстрагировали этилацетатом (6 л). Оставшуюся водную фазу доводили до pH 3~4 водным раствором бисульфата калия (15.6 л) и затем экстрагировали три раза этилацетатом (6 л). Органические фазы объединяли и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (6 л). Органическую фазу сушили над 1200 г безводного сульфата натрия ($m/m = 1:1$) и упаривали при пониженном давлении при 45°C , получая сырой продукт. Добавляли к сырому продукту дихлорметан (2.4 л) и изопропиловый эфир (7.2 л), и смесь перемешивали при комнатной температуре 0.5 часа. Полученную смесь фильтровали и собирали осадок на фильтре, получая **I-1-3**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) $\delta = 13.18$ (ушир.с, 1H), 6.20 (ушир.с, 1H), 4.93 - 4.82 (м, 4H), 1.09 (с, 9H).

Стадия 2: Синтез соединения **I-1-4**.

Дихлорметан (1330 мл), **I-1-3** (1330 г, 1.99 моль, сырой продукт) и 4-диметиламинопиридин (41.37 г, 338.61 ммоль) последовательно добавляли в реакционную колбу. Порциями добавляли N,N'-карбонилдиимидазол (419.86 г, 2.59 моль), и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 36 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор 2н. водный раствор соляной кислоты (5.32 л), доводя значение pH до 3-4. Полученную смесь перемешивали 0.5 часа, затем добавляли воду (5.32 л). Полученную смесь упаривали для удаления органического растворителя. Остаток фильтровали, получая осадок на фильтре. Осадок на фильтре перемешивали с водным раствором бикарбоната натрия (5.32 л) 0.5 часа, затем фильтровали и промывали водой (2.66 л). Осадок на фильтре собирали. Добавляли к сырому продукту абсолютный этанол (10.64 л). Полученную смесь перемешивали в течение 2 часов и фильтровали. Осадок на фильтре промывали абсолютным этанолом (1.3 л). Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **I-1-4**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) $\delta = 9.58$ (ушир.с, 1H), 4.94 - 4.84 (м, 4H).

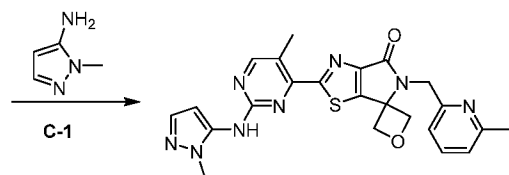
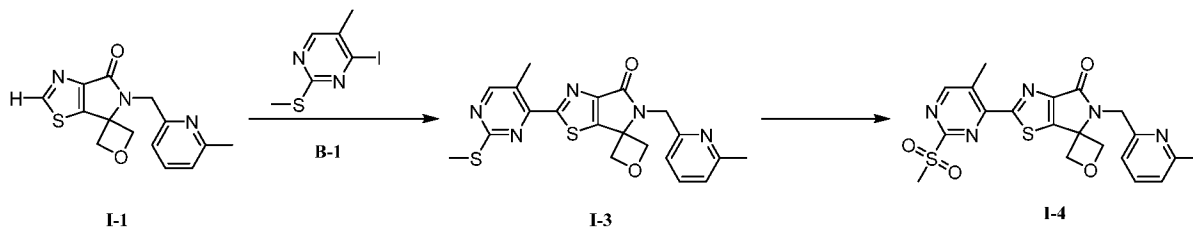
Стадия 3: Синтез соединения **I-1-6**.

В реакционную колбу помещали **I-1-4** (283 г, 1.03 моль), карбонат цезия (505.36 г, 1.55 моль) и N,N'-диметилформаид (2800 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли **I-1-5** (221.24 г, 1.19 моль), и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов. После окончания реакции медленно выливали реакционный раствор в ледяную воду (14 л). Полученную смесь перемешивали 1 час и фильтровали.

Собирали осадок на фильтре. Добавляли к сырому продукту метил-трет-бутиловый эфир (5 л), смесь перемешивали в течение 2 часов и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **I-1-6**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ = 7.63 (т, J = 7.7 Гц, 1H), 7.13 (дд, J = 2.8, 7.7 Гц, 2H), 5.04 (д, J = 7.4 Гц, 2H), 4.98 (с, 2H), 4.86 (д, J = 7.4 Гц, 2H), 2.41 (с, 3H).

Стадия 4: Синтез соединения **I-1**.

Параллельно проводили три реакции. В реакционную колбу помещали **I-1-6** (183 г, 468.60 ммоль) и тетрагидрофуран (2745 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Диизопропилэтиламин (181.69 г, 1.41 моль) и диэтилфосфит (194.14 г, 1.41 моль) медленно добавляли по каплям при 20 °С, и реакционную смесь перемешивали при 40°С в течение 16 часов. После окончания реакции реакционный раствор разводили водой (915 мл) и экстрагировали дихлорметаном (1830 мл*3). Органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (915 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при 45°С и сушили, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт добавляли в смесь метил-трет-бутилового эфира и н-гексана (суммарно 1098 мл, соотношение объемов 1:5), и реакционную смесь перемешивали 1 час. Полученную смесь фильтровали, осадок на фильтре собирали и сушили. Осадок на фильтре добавляли в воду (5400 мл), реакционную смесь перемешивали 1 час и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **I-1**. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ = 9.32 (с, 1H), 7.64 (т, J = 7.6 Гц, 1H), 7.13 (т, J = 8.4 Гц, 2H), 5.10 (д, J = 7.4 Гц, 2H), 4.99 (с, 2H), 4.81 (д, J = 7.5 Гц, 2H), 2.42 (с, 3H).



WX001 crystal form A

Стадия 5: Синтез соединения **I-3**.

В две реакционные колбы помещали соответственно раствор **I-1** (120 г, 403.05 ммоль) и хлорида цинка (0.7 М, 575.79 мл) в тетрагидрофуране (1200 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Полученную смесь охлаждали до 0°С и медленно добавляли по каплям гексаметилдисилазид лития (1 М, 806.11 мл). Полученную смесь оставляли нагреваться до 20°С и затем перемешивали 1 час, получая реакционный раствор

1. В другую реакционную колбу добавляли **B-1** (107.25 г, 403.05 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладий (13.97 г, 12.09 ммоль) и N,N'-диметилформамид (600 мл), и реакционный раствор нагревали до 50°C, получая реакционный раствор 2. Реакционный раствор 1 медленно добавляли по каплям в реакционный раствор 2, и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 1 часа. После окончания реакции реакционную смесь гасили добавлением 0.1M раствора динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (10800 мл) и перемешивали 30 минут. Добавляли н-гептан (4800 мл) и перемешивали смесь 0.5 часа. Полученную смесь фильтровали, осадок на фильтре собирали и сушили, получая сырой продукт. Полученный сырой продукт суспендировали этанолом (7200 мл) при 20°C в течение 2 часов и фильтровали. Осадок на фильтре собирали и сушили, получая **I-3**. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8.54 (с, 1H), 7.54 (т, J = 7.2 Гц, 1H), 7.19 (д, J = 7.4 Гц, 1H), 7.07 (д, J = 7.3 Гц, 1H), 5.29 (д, J = 7.5 Гц, 2H), 5.11 (с, 2H), 4.84 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 2.73 (с, 3H), 2.66 (с, 3H), 2.52 (с, 3H).

Стадия 6: Синтез соединения **I-4**.

В реакционную колбу помещали **I-3** (120 г, 282.00 ммоль), ацетонитрил (110 мл) и воду (550 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Добавляли моноперсульфат калия (329.40 г, 535.81 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 30 °C в течение 12 часов. После окончания реакции добавляли в реакционный раствор 200 мл смеси лед-вода. Затем добавляли насыщенный водный раствор бикарбоната натрия и насыщенный водный раствор тиосульфата натрия (600 мл каждого), после этого добавляли 600 мл воды. Полученную смесь фильтровали, осадок на фильтре собирали и сушили, получая сырой продукт. Добавляли к сырому продукту 600 мл абсолютного этанола, и реакционную смесь перемешивали 1 час. Полученную смесь фильтровали и собирали осадок на фильтре, получая **I-4**. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8.90 (с, 1H), 7.55 (т, J = 7.7 Гц, 1H), 7.20 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 7.06 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 5.31 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 5.11 (с, 2H), 4.84 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 3.44 (с, 3H), 2.92 (с, 3H), 2.50 (с, 3H).

Стадия 7: Синтез кристаллической формы **A** соединения **WX001**.

В реакционную колбу помещали **I-4** (47 г, 102.73 ммоль), **C-1** (25.94 г, 267.09 ммоль), дихлорметан (470 мл) и тетрагидрофуран (470 мл). Атмосферу в реакционной колбе заменяли азотом. Гексаметилдисилазид лития (1 M, 246.54 мл, 2.4 экв.) добавляли по каплям при -5°C (внутреннюю температуру поддерживали в диапазоне -5-3°C), и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 0.5 часа. После окончания реакции гасили смесь деионизованной водой (470 мл). Полученную смесь упаривали для удаления органического растворителя и фильтровали. Осадок на фильтре собирали. Осадок на фильтре перемешивали с деионизованной водой (1000 мл) при комнатной температуре 30

минут и фильтровали. Осадок на фильтре собирали. Осадок на фильтре перемешивали с ацетонитрилом (1000 мл) при комнатной температуре 30 минут и фильтровали. Осадок на фильтре собирали, получая **кристаллическую форму А соединения WX001**. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta = 8.44$ (с, 1H), 7.60 - 7.50 (м, 2H), 7.18 (д, J = 7.4 Гц, 1H), 7.06 (д, J = 7.6 Гц, 1H), 6.88 (с, 1H), 6.42 (д, J = 1.9 Гц, 1H), 5.27 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 5.12 (с, 2H), 4.85 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 3.85 (с, 3H), 2.69 (с, 3H), 2.52 (с, 3H). XRPD диаграмма кристаллической формы А соединения WX001 показана на Фиг. 1; ДСК кривая кристаллической формы А соединения WX001 показана на Фиг. 2; и ТГА кривая кристаллической формы А соединения WX001 показана на Фиг.3.

Пример 3: Полиморфный скрининг WX001

1. Пенетрация газа в твердое вещество

Примерно по 20 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в 3-миллилитровую виалу, и примерно 4 мл растворителя помещали в 20-миллилитровую виалу. 3-миллилитровую виалу (открытую) помещали в 20-миллилитровую виалу, и 20-миллилитровую виалу герметично закрывали. Образцы поглощали растворитель и частично растворялись, или их оставляли при комнатной температуре на 7 дней и затем твердые вещества собирали и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Результаты теста пенетрации газа в твердое вещество

| Растворитель | Результаты теста |
|------------------|-------------------------|
| MeOH | Кристаллическая форма А |
| Ацетон | Кристаллическая форма А |
| EtOAc | Кристаллическая форма А |
| MTBE | Кристаллическая форма А |
| ACN | Кристаллическая форма А |
| Толуол | Кристаллическая форма А |
| 1,4-Диоксан | Кристаллическая форма А |
| H ₂ O | Кристаллическая форма А |

2. Диффузия газа в жидкость

Примерно по 20 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в 3-миллилитровую виалу и растворяли в 1.2~1.8 мл растворителя. Примерно 4 мл анти-растворителя помещали в 20-миллилитровую виалу. 3-миллилитровую виалу (открытую), содержащую прозрачный раствор, помещали в 20-миллилитровую виалу, и затем 20-миллилитровую виалу герметично закрывали и оставляли стоять при комнатной

температуре. Полученное твердое вещество отделяли и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Результаты теста пенетрации газа в жидкость

| Растворитель | Анти-растворитель | Результаты теста |
|-------------------|-------------------|--------------------------|
| CHCl ₃ | Ацетон | Кристаллическая форма А |
| ДМСО | EtOAc | Кристаллическая форма А* |
| | Толуол | Кристаллическая форма А* |

* означает, что твердое вещество было получено испарением при комнатной температуре.

3. Медленное испарение

15~20 мг кристаллической формы А соединения WX001 отвешивали в 3-миллилитровую виалу и растворяли в 1.0~3.0 мл растворителя. Виалу герметично закрывали герметизирующей пленкой и делали в пленке 4 отверстия иглой. Раствор оставляли стоять при комнатной температуре для медленного испарения. Полученное твердое вещество отделяли и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Результаты теста медленного испарения

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|----------------------------|-------------------------|
| MeOH/ДХМ (1:1) | Кристаллическая форма А |
| ТГФ/Н ₂ О (1:1) | Кристаллическая форма А |
| CHCl ₃ | Кристаллическая форма А |
| 1,4-диоксан | Кристаллическая форма А |

4. Медленное охлаждение

15~35 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в 3-миллилитровую виалу и растворяли в 1.0~3.0 мл растворителя. Раствор перемешивали и уравнивали при 50°C примерно 3.5 часа и затем фильтровали. Собирали надосадочный раствор. Полученный надосадочный раствор помещали в биохимический инкубатор, охлаждали с 50°C до 5°C при 0.1°C/мин и затем выдерживали при постоянной температуре 5°C. Выпавший осадок отделяли и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 10.

Таблица 10. Результаты теста медленного охлаждения

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|----------------------------|--------------------------|
| CHCl ₃ | Кристаллическая форма А* |
| ТГФ/Н ₂ О (1:1) | Кристаллическая форма А* |

| | |
|----------------------------|--------------------------|
| ACN/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А* |
|----------------------------|--------------------------|

* означает, что образец был прозрачный при 5°C и -20°C, и твердое вещество было получено испарением при комнатной температуре.

5. Перемешивание с циклическим изменением температуры

Примерно 25 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в ВЭЖХ виалу и добавляли 0.5 мл соответствующего растворителя. Полученную суспензию подвергали программе циклического изменения температуры (образец нагревали до 50°C и затем охлаждали до 5°C со скоростью 0.1°C/мин; затем этот цикл повторяли; наконец, образец выдерживали при 5°C) при перемешивании на магнитной мешалке (1000 об/мин). Твердые вещества отделяли центрифугированием и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 11.

Таблица 11. Результаты теста перемешивания при циклическом изменении температуры

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|-----------------------------|-------------------------|
| MeOH | Кристаллическая форма А |
| MIBK | Кристаллическая форма А |
| EtOAc | Кристаллическая форма А |
| ТГФ/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А |
| ACN/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А |
| DMAc/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А |

6. Перемешивание суспензии при комнатной температуре

Примерно 25 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в ВЭЖХ виалу и добавляли 0.5 мл соответствующего растворителя. Полученную мутную жидкость перемешивали на магнитной мешалке (1000 об/мин) при комнатной температуре 3 дня. Твердые вещества отделяли центрифугированием и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 12.

Таблица 12. Результаты теста перемешивания суспензии при комнатной температуре

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|----------------------|-------------------------|
| EtOH | Кристаллическая форма А |
| EtOAc | Кристаллическая форма А |
| ТГФ | Кристаллическая форма А |
| ДХМ | Кристаллическая форма А |
| н-Гептан | Кристаллическая форма А |
| H ₂ O | Кристаллическая форма А |

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|--|-------------------------|
| EtOH/H ₂ O (0.97:0.03, a _w ~0.2) | Кристаллическая форма А |
| EtOH/H ₂ O (0.93:0.07, a _w ~0.4) | Кристаллическая форма А |
| EtOH/H ₂ O (0.86:0.14, a _w ~0.6) | Кристаллическая форма А |
| EtOH/H ₂ O (0.71:0.29, a _w ~0.8) | Кристаллическая форма А |
| АСN | Кристаллическая форма А |

7. Перемешивание суспензии при 50°C

Примерно 25 мг кристаллической формы А соединения WX001 в каждой порции отвешивали в ВЭЖХ виалу и добавляли 0.5 мл соответствующего растворителя. Полученную мутную жидкость перемешивали на магнитной мешалке (1000 об/мин) при 50°C в течение 3 дней. Твердые вещества отделяли центрифугированием и анализировали методом XRPD. Результаты исследования представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Результаты теста перемешивания суспензии при 50°C

| Растворитель (об/об) | Результаты теста |
|-----------------------------------|-------------------------|
| ИПС | Кристаллическая форма А |
| Ацетон/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А |
| РАс | Кристаллическая форма А |
| МТБЭ | Кристаллическая форма А |
| 2-МеТГФ | Кристаллическая форма А |
| 1,4-диоксан | Кристаллическая форма А |
| CHCl ₃ /н-гептан (1:1) | Кристаллическая форма А |
| Толуол | Кристаллическая форма А |
| ДМСО/H ₂ O (1:1) | Кристаллическая форма А |
| АСN | Кристаллическая форма А |

8. Добавление анти-растворителя

Примерно 15 мг кристаллической формы А соединения WX001 отвешивали в 20-миллилитровую виалу и добавляли 0.7~1.0 мл соответствующего растворителя для полного растворения твердого вещества. Добавляли анти-растворитель по каплям в прозрачный раствор при перемешивании (1000 об/мин) до выпадения осадка или до момента, когда общий объем анти-растворителя достигал 10 мл. Образцы без осадка перемешивали при 5°C до выпадения осадка. Прозрачные образцы затем перемешивали при -20°C до выпадения осадка. Оставшиеся прозрачными образцы затем упаривали при комнатной температуре. Выпавший осадок отделяли и анализировали

методом XRPD. Полученные результаты представлены в Таблице 14.

Таблица 14. Результаты теста добавления анти-растворителя

| Растворитель (об/об) | Анти-растворитель (об/об) | Результаты теста |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| CHCl ₃ | MeOH | Кристаллическая форма А* |
| | Ацетон | Кристаллическая форма А |
| | EtOAc | Кристаллическая форма А |
| | MTBE | Кристаллическая форма А |
| | 2-MeTHF | Кристаллическая форма А |
| | ACN | Кристаллическая форма А |
| | н-гептан | Кристаллическая форма А |
| | Толуол | Кристаллическая форма А |
| MeOH/ДХМ (1:1) | MIBK | Кристаллическая форма А |
| | IPAc | Кристаллическая форма А |
| | MTBE | Кристаллическая форма А |
| THF/H ₂ O (1:1) | H ₂ O | Кристаллическая форма А |
| NMP | H ₂ O | Кристаллическая форма А |
| DMAc | H ₂ O | Кристаллическая форма А |

* означает, что образец был прозрачный при комнатной температуре, и твердое вещество было получено перемешиванием при 5°C.

Пример 4: Исследование гигроскопичности кристаллической формы А соединения WX001

Материалы для анализа:

Аппарат для исследования динамической сорбции паров (ДСП) SMS DVS Advantage

Методика проведения исследования:

10~30 мг кристаллической формы А соединения WX001 отвешивали и помещали для анализа в ячейку прибора ДСП.

Результаты исследования:

Диаграмма ДСП кристаллической формы А соединения WX001 показана на Фиг. 4, $\Delta W = 0.1134\%$.

Вывод по результатам анализа:

Увеличение веса кристаллической формы А соединения WX001 за счет поглощения влаги при 25°C и 80% RH составило 0.1134%, и это показывает, что кристаллическая форма А соединения WX001 практически не обладает гигроскопичностью.

Пример 5: Тест стабильности кристаллической формы А соединения WX001

12 порций образцов кристаллической формы А соединения WX001 взвешивали параллельно, каждая порция имела вес около 5 мг. Образец помещали на дно ВЭЖХ пробирки, формируя тонкий слой. Образцы помещали в камеру с постоянной температурой и влажностью (60°C/75% RH) и в эксикатор с относительной влажностью 92.5% RH. Флаконы герметично закрывали пленкой. Протыкали несколько отверстий в герметизирующей пленке для гарантии того, что образцы находятся в полном контакте с окружающим воздухом. Закручивали крышки на флаконах с образцами, которые помещали при 60°C в условия освещенности и в защищенные от света условия (образцы в условиях, защищенных от света, оборачивали алюминиевой фольгой). Результаты тестирования приведены ниже в Таблице 15:

Таблица 15. Результаты тестирования стабильности твердой кристаллической формы А соединения WX001

| Условия теста | Условия регистрации показателей | Кристаллическая форма |
|---|--|-------------------------|
| 0 день | -- | Кристаллическая форма А |
| 60°C | 5 дней | Кристаллическая форма А |
| | 10 дней | Кристаллическая форма А |
| 92.5% RH | 5 дней | Кристаллическая форма А |
| | 10 дней | Кристаллическая форма А |
| Видимый свет [#] | Достигается освещенность 1.2E+06 люкс·час | Кристаллическая форма А |
| Контрольная группа, защищенная от света | Регистрация показателей одновременно с группой на видимом свете | Кристаллическая форма А |
| Видимый свет + УФ [#] | Достигается освещенность 200 Вт·час/м ² | Кристаллическая форма А |
| Контрольная группа, защищенная от света | Регистрация показателей одновременно с группой на видимом свете + УФ | Кристаллическая форма А |
| 60°C/75% RH | 1 месяц | Кристаллическая форма А |
| | 2 месяца | Кристаллическая форма А |
| | 3 месяца | Кристаллическая форма А |

[#]: ICH условия

Вывод: кристаллическая форма А соединения WX001 обладает хорошей стабильностью.

Пример исследования 1. Исследование активности киназы *in vitro*

1. Цель исследования:

Определяли способность соединения ингибировать активность киназ ERK1 и

ERK2.

2. Буфер для проведения исследования:

20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM этиленбис(оксиэтиленнитрило) тетрауксусная кислота (EGTA), 0.02% Triton X-100, 0.02 мг/мл альбумин бычьей сыворотки (BSA), 0.1 mM Na₂VO₄, 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:

1) Готовили раствор субстрата MBP в свежеприготовленном реакционном буфере;

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

3) 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;

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

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

6) Уровень радиоактивности детектировали методом связывания с фильтром;

7) 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 IC₅₀.

5. Результаты исследования приведены в Таблице 16 и Таблица 17:

Таблица 16: Результат исследования активности ERK1 киназы

| Соединение | ERK1 |
|------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ (нМ) |
| WX001 | 1.4 |

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

Таблица 17: Результат исследования активности ERK2 киназы

| Соединение | ERK2 |
|------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ (нМ) |
| WX001 | 0.54 |

Вывод: Соединение по настоящему изобретению проявляет прекрасную ингибирующую активность в отношении ERK2 киназы.

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

1. Цель исследования:

Оценивали способность соединения ингибировать пролиферацию опухолевых клеток HT29.

2. Подготовка соединения:

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

3. Методика проведения исследования:

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

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

3) 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;

4) 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;

5) 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;

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

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

8) Стоковый раствор соединения подвергали серийным разведениям в ДМСО и добавляли соединение в планшет с клетками, используя Tecan;

9) Планшет с клетками и добавленными соединениями, а также CellTiterGlo

уравновешивали 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 IC₅₀ для каждого соединения.

4. Результаты исследования приведены в Таблице 3:

Таблица 18: Результаты исследования активности клеток *in vitro*

| Соединение | HT29 |
|--------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ (нМ) |
| WX001 | 66 |

Вывод: Соединение по настоящему изобретению проявляет прекрасную ингибирующую активность в отношении пролиферации HT29 клеток.

Пример исследования 3. *In vivo* исследование фармакокинетики на мышах

1. 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 19:

Таблица 19: 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) |
|--------------|---------------------------|-----|---------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| WX001 | 4790 | 154 | 2935 | 1.23 | 18.9 | 1.1 |

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

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 (рН 2.0): 50 мМ фосфатный буфер, рН 2.0; Буфер В (рН 6.5): 50 мМ фосфатный буфер, рН 6.5; Буфер С (рН 7.4): 50 мМ фосфатный буфер, рН 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;

в) 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;

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

3. Методика проведения исследования:

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

2) 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 pH соответствующих растворов составляло 2.0, 6.5 и 7.4, соответственно. Теоретическая максимальная концентрация исследуемого соединения составляла 200 мкМ с 2% ДМСО;

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

4) 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;

5) Концентрацию соединения определяли с помощью ВЭЖХ-УФ. Условия ВЭЖХ приведены в Таблице 20:

Таблица 20: 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 |

6) Три стандартных раствора для УФ-детектирования от низшей до высшей концентрации (1 мкМ, 20 мкМ, 200 мкМ) закалывали в ВЭЖХ хроматограф, и затем закалывали исследуемый образец тестируемого соединения;

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

4. Результаты исследования приведены в Таблице 21:

Таблица 21: Результаты исследования растворимости соединения

| Соединение | Растворимость при разных значениях pH | | |
|--------------|---------------------------------------|----------|----------|
| | pH=2.0 | pH=6.5 | pH=7.4 |
| WX001 | 199.5 мкМ | 2.94 мкМ | 2.64 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 бестимульных мышей.

2. Подопытные животные:

Вид: мышь

Линия: BALB/c бестимульная 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% CO₂. 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 (5×10^5) клеток A375 инокулировали подкожно в правую подмышечную впадину каждой мыши. Когда средний объем опухоли достигал 170 мм³, животных случайным образом делили на 4 группы и начинали введение. Группировка и расписание введения в данном исследовании показаны в Таблице 22.

Таблица 22: 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 | WX001 | 12.5 | 21 день | Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID) |
| 3 | 6 | WX001 | 25 | 21 день | Пероральное введение (PO), два раза в сутки (BID) |
| 4 | 6 | WX001 | 50 | 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

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

б) 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:

а) 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;

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

5. Результаты исследования:

1) Как показано в Таблице 23 и на Фиг. 5, 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 12.5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг, и значение TGI составляло 45%, 58% и 102%, соответственно.

2) Вес тела подопытных животных использовали как справочный показатель для косвенной оценки токсичности лекарства. Как показано на Фиг. 6, при введении вплоть до Дня 21 вес тела всех животных в контрольной группе на растворителе и в группе на **WX001** существенно не снижался, и наблюдалась хорошая переносимость.

Таблица 23: Результаты *in vivo* исследования эффективности в мышинной модели A375

| Лекарство | TGI |
|------------------------------------|------|
| WX001 (12.5 мг/кг, PO, BID) | 45% |
| WX001 (25 мг/кг, PO, BID) | 58% |
| WX001 (50 мг/кг, PO, BID) | 102% |

Вывод: **WX001** ингибирует рост опухоли дозозависимым образом в трех дозировках 12.5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 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 24:

Таблица 24: Результаты исследования фармакокинетики соединения

| Соединение | C_{\max} (нМ) | F% | Перорально DNAUC (нМ.ч/ мг/кг) | Vd_{ss} (л/кг) | Cl (мл/мин/кг) | $T_{1/2}$ (ч) |
|--------------|-----------------|-----|--------------------------------------|------------------|-------------------|---------------|
| WX001 | 2500 | 49% | 1445.79 | 1.08 | 13.4 | 3.77 |

Примечание: C_{\max} = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC = $AUC_{PO}/\text{Доза}$, AUC_{PO} = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства; Vd_{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 25:

Таблица 25: Результаты исследования фармакокинетики соединения

| Соединение | $C_{\text{макс}}$ (нМ) | F% | Перорально DNAUC (нМ.ч/ мг/кг) | Vd_{ss} (л/кг) | Cl (мл/мин/кг) | $T_{1/2}$ (ч) |
|--------------|---------------------------|-----|--------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| WX001 | 921 | 50% | 1152.35 | 1.98 | 16.1 | 2.41 |

Примечание: $C_{\text{макс}}$ = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC = $AUC_{PO}/\text{Доза}$, AUC_{PO} = площадь под кривой при пероральном введении, и Доза = доза лекарства; Vd_{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 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-β-CD: гидроксипропил-β-циклодекстрин.

3. Результаты исследования приведены в Таблице 26:

Таблица 26: 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) |
|--------------|---------------------------|-----|--------------------------------------|------------------------|-------------------|---------------|
| WX001 | 1769 | 60% | 2307.32 | 1.29 | 10.1 | 3.48 |

Примечание: $C_{\text{макс}}$ = максимальная концентрация; F% = пероральная биодоступность; DNAUC = AUC_{PO}/Доза, AUC_{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 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

CHO-hERG клетки выращивали в культуральной колбе размером 175 см². 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 $2\sim 5 \times 10^6$ /мл.

2.2 Приготовление раствора

Внеклеточный раствор (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.25 MgCl₂, 10 HEPES и 10 Глюкоза; препарат доводили до pH 7.4 с помощью NaOH.

Внутриклеточный раствор (мМ): 140 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 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 27:

Таблица 27: Результат исследования действия соединения на hERG

| Соединение | IC50 (мкМ) |
|--------------|------------|
| WX001 | > 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 рН полученной плазмы крови измеряли и доводили до 7.4 ± 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 (T_0) 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% H_3PO_4 в H_2O и 480 мкл останавливающего раствора, содержащего внутренний стандарт, к образцу T_0 исследуемого соединения. Их далее хранили с другими образцами при 2-8°C для дальнейшей обработки.

б) Оставшиеся образцы плазмы преинкубировали в инкубаторе с диоксидом углерода при $37 \pm 1^\circ C$ 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 $37^\circ C$ и 155000 g (35000 об/мин) в течение 4 часов.

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

г) После окончания центрифугирования, 30 мкл образцов без белка и 30 мкл T 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 H_3PO_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 28:

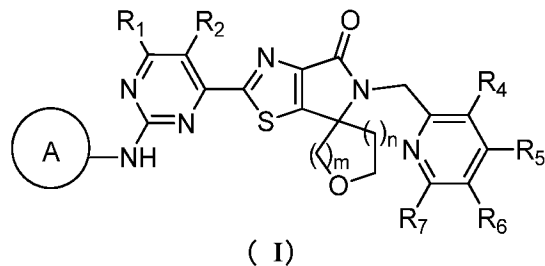
Таблица 28: Результаты исследования связывания соединения с белками плазмы крови

| Соединение | Степень связывания с белками плазмы крови (% несвязанного) | | | | |
|--------------|--|-------|---------|--------|---------|
| | Человек | Mouse | Человек | Canine | Человек |
| WX001 | 15.9% | 11.7% | 8.4% | 14.3% | 14.2% |

Вывод: Соединение по настоящему изобретению демонстрирует умеренное связывание с белками плазмы крови.

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 необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя R_a ;

R_4 , R_5 , R_6 и R_7 каждый независимо выбраны 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 равен 0 или 1;

m равен 1 или 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.

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 необязательно 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 .

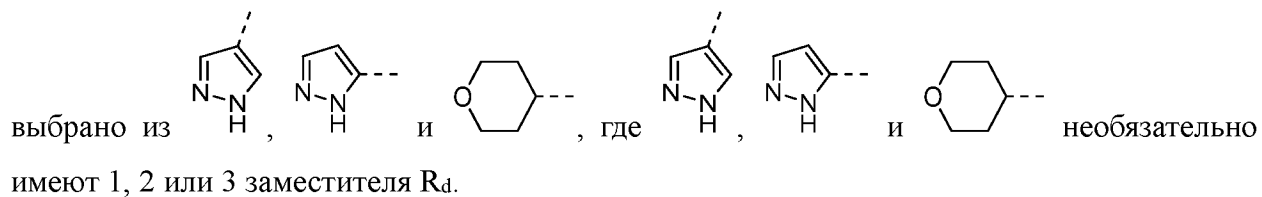
4. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где R_4 , R_5 , R_6 , и R_7 каждый независимо выбраны из H, F, Cl, Br, I и CH_3 , где CH_3 необязательно имеет 1, 2 или 3 заместителя R_c .

5. Соединение по п. 4 или его фармацевтически приемлемая соль, где R_4 , R_5 , R_6 и R_7 каждый независимо выбраны из H, F, Cl, Br, I и CH_3 .

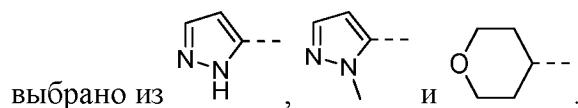
6. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где R_d выбран из F, Cl, Br, I, CH_3 и OCH_3 , где CH_3 и OCH_3 необязательно имеют 1, 2 или 3 заместителя R.

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

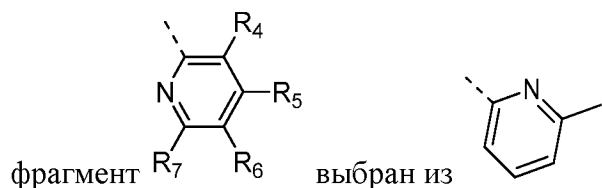
8. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо А



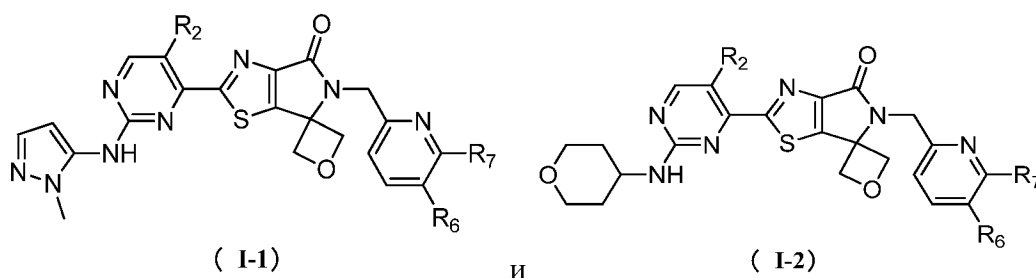
9. Соединение по п. 8 или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо А



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



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

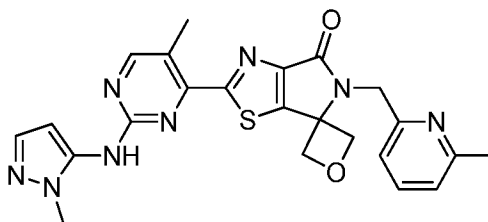


где

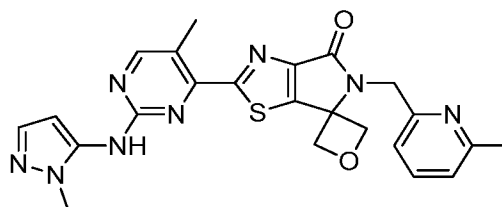
R₂ является таким как определено в любом из пп. 1 - 3;

R₆ и R₇ является таким как определено в любом из пп. 1, 4 или 5.

12. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой



13. Кристаллическая форма А соединения WX001, которая характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ: 10.2080±0.2000°, 18.8429±0.2000°, 20.6217±0.2000°;

**WX001**

14. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 13, где порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, $20.6217\pm 0.2000^\circ$, $25.0767\pm 0.2000^\circ$, $25.4797\pm 0.2000^\circ$.

15. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 14, где порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $15.2687\pm 0.2000^\circ$, $17.6747\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, $20.6217\pm 0.2000^\circ$, $21.0531\pm 0.2000^\circ$, $25.0767\pm 0.2000^\circ$, $25.4797\pm 0.2000^\circ$.

16. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 15, где порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ $10.2080\pm 0.2000^\circ$, $14.4684\pm 0.2000^\circ$, $15.2687\pm 0.2000^\circ$, $17.6747\pm 0.2000^\circ$, $18.8429\pm 0.2000^\circ$, $20.6217\pm 0.2000^\circ$, $21.0531\pm 0.2000^\circ$, $21.5713\pm 0.2000^\circ$, $22.0420\pm 0.2000^\circ$, $22.4540\pm 0.2000^\circ$, $25.0767\pm 0.2000^\circ$, $25.4797\pm 0.2000^\circ$.

17. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 16, где порошковая рентгеновская дифрактограмма содержит характеристичные дифракционные пики при значениях углов 2θ 10.2080° , 10.4856° , 14.4684° , 15.0133° , 15.2687° , 15.9518° , 16.6214° , 17.6747° , 17.9514° , 18.4703° , 18.8429° , 19.1531° , 20.6217° , 21.0531° , 21.2894° , 21.5713° , 22.0420° , 22.4540° , 25.0767° , 25.4797° , 26.3255° , 26.9544° .

18. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 17, у которой XRPD диаграмма в целом такая, как показано на Фиг. 1.

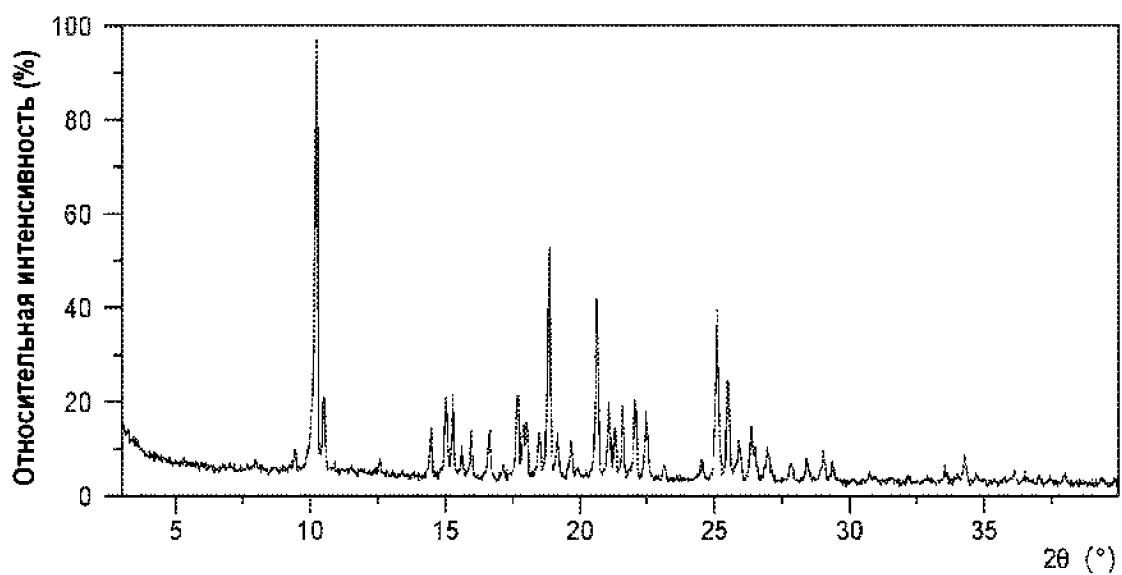
19. Кристаллическая форма А соединения WX001 по любому из пп. 13 - 18, которая имеет кривую дифференциальной сканирующей калориметрии с началом эндотермического пика при $241.0\pm 3.0^\circ\text{C}$.

20. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 19, у которой кривая ДСК такая как изображена на Фиг. 2.

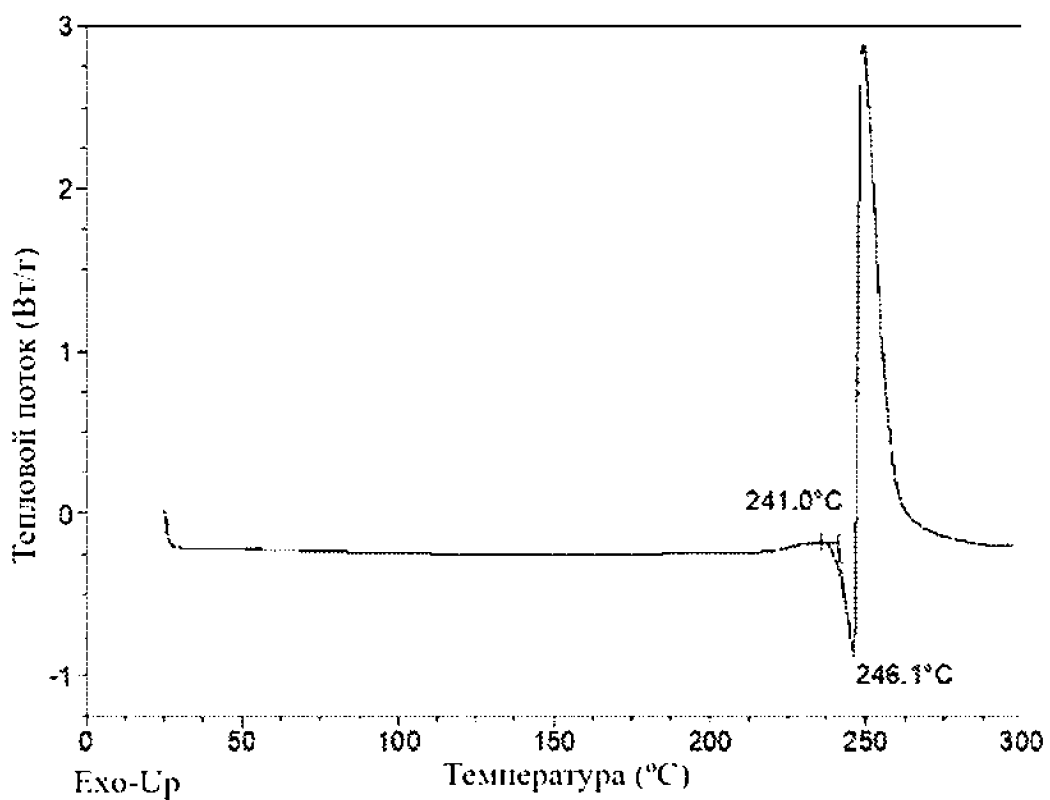
21. Кристаллическая форма А соединения WX001 по любому из пп. 13 - 18, которая имеет кривую термогравиметрического анализа с потерей веса до 0.83% при $150.0\pm 3.0^\circ\text{C}$.

22. Кристаллическая форма А соединения WX001 по п. 21, у которой кривая ТГА такая как изображена на Фиг. 3.

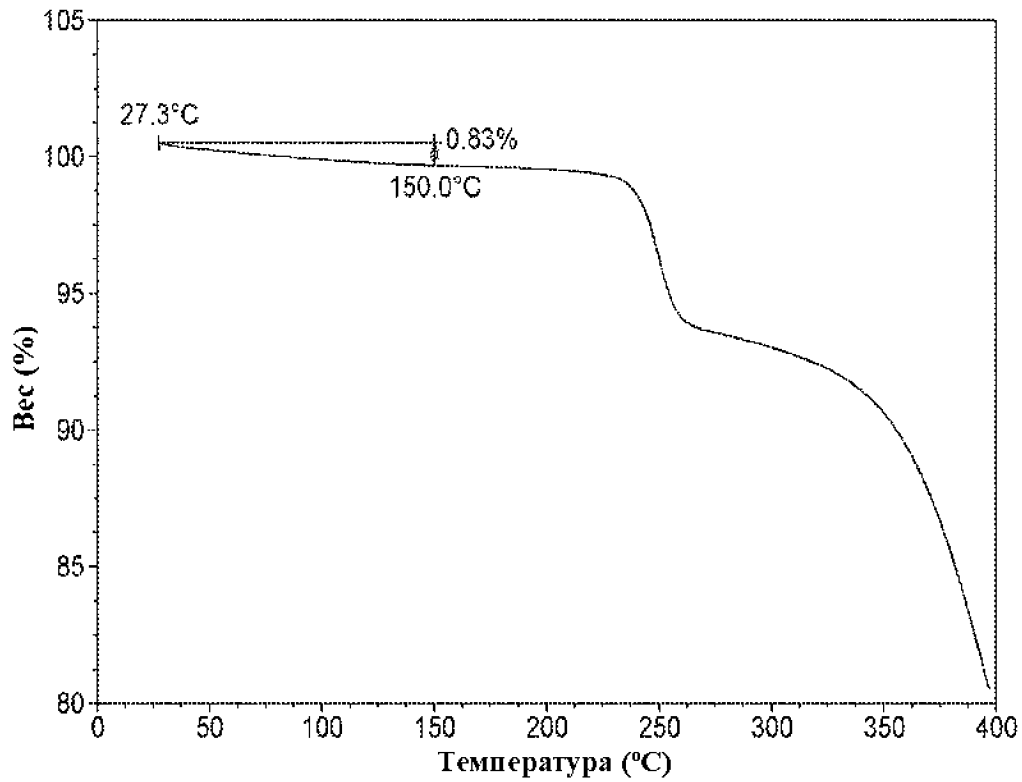
23. Применение соединения по любому из пп. 1 - 12 или его фармацевтически приемлемой соли или кристаллической формы А соединения WX001 по любому из пп. 13 - 22 в производстве лекарственного средства для лечения солидной опухоли.



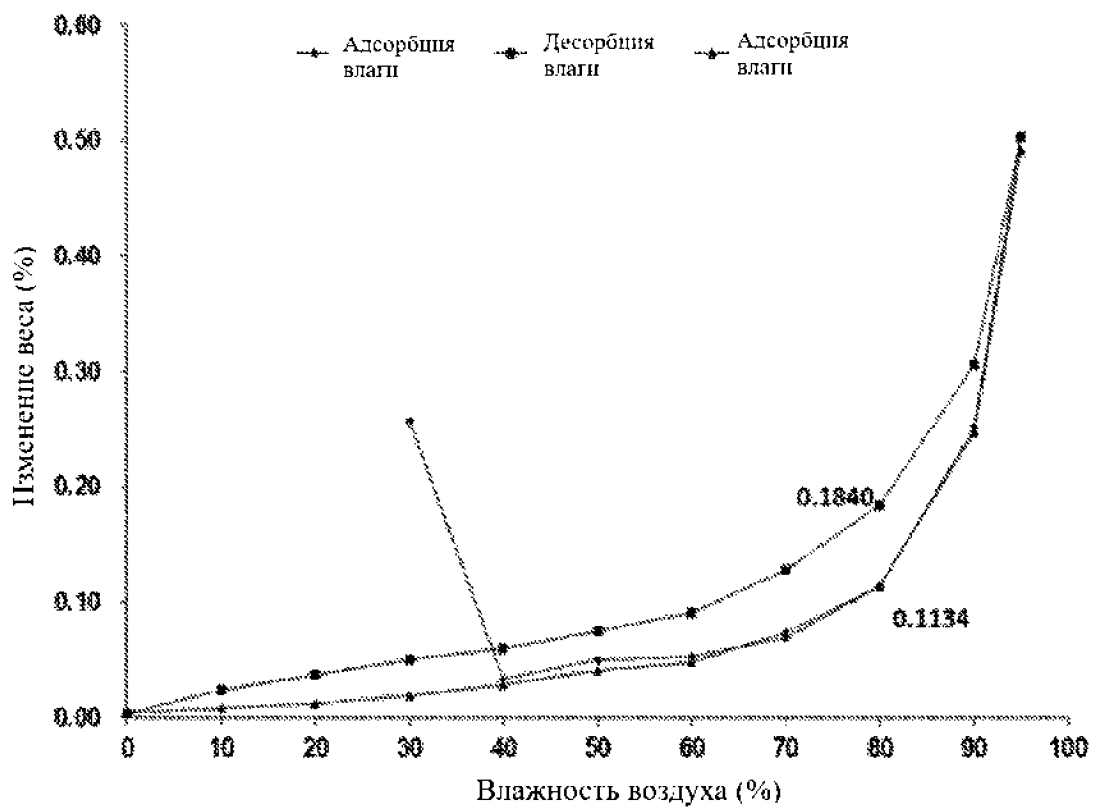
ФИГ. 1



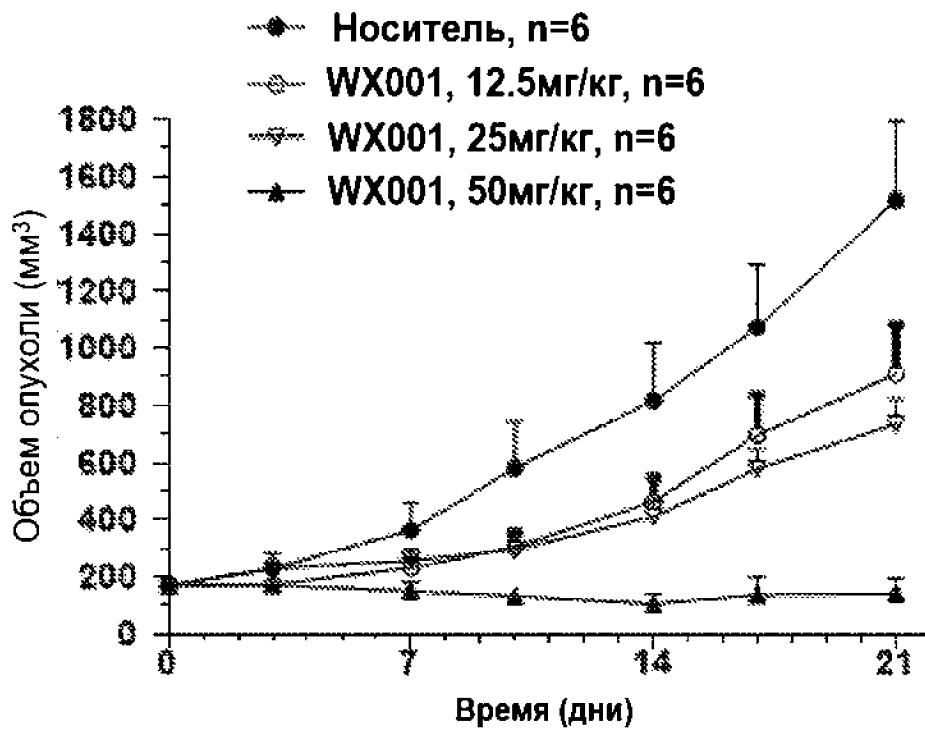
ФИГ. 2



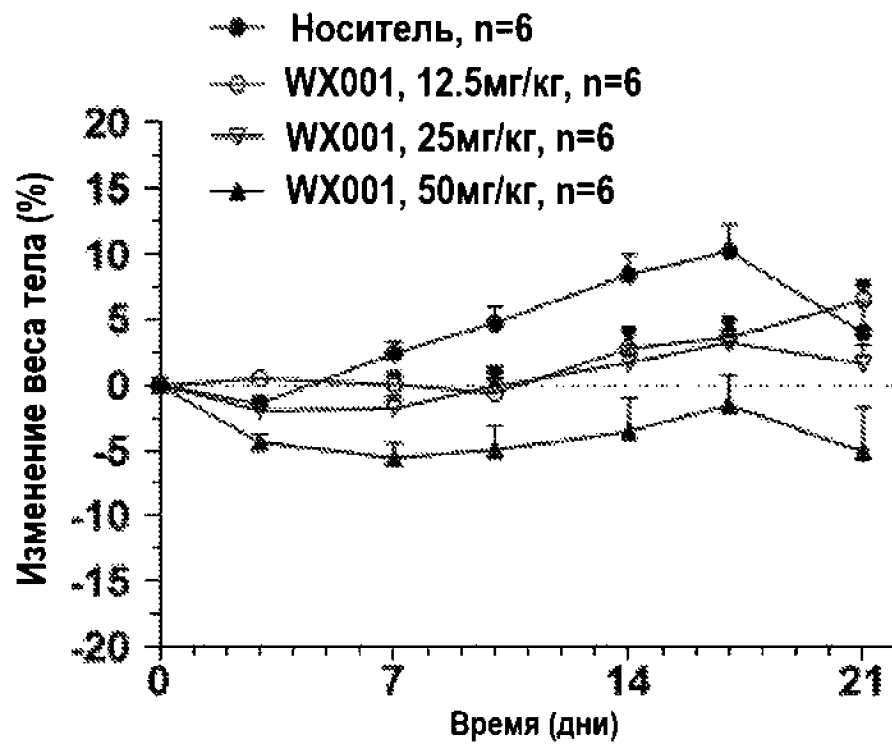
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6