

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490694 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.23

(22) Дата подачи заявки
2022.09.09

(51) Int. Cl. C07D 403/04 (2006.01)
C07D 419/04 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА ПИРИМИДИНОВОГО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 202111062619.1; 202211034826.0

(32) 2021.09.10; 2022.08.26

(33) CN

(86) PCT/CN2022/118023

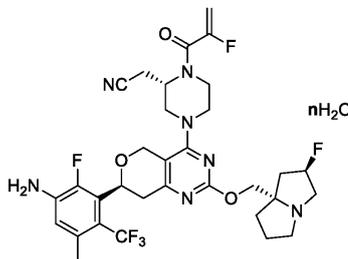
(87) WO 2023/036282 2023.03.16

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

(72) Изобретатель:
Сюй Яньян, Сунь Цзикуй, У Вэньтао,
Чжан Ян, Чэнь Шухуэй (CN)

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

(57) Описана кристаллическая форма пиримидинового гетероциклического соединения и способ ее получения. В частности, раскрыт способ получения и применение соединения формулы (II) и его кристаллической формы.



A1

202490694

202490694

A1

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА ПИРИМИДИНОВОГО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

В настоящей заявке истребуется приоритет, заявленный в заявках:

CN202111062619.1, поданной 10 сентября 2021г.;

CN202211034826.0, поданной 26 августа, 2022г.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается кристаллической формы класса пиримидиновых гетероциклических соединений и способа ее получения, конкретнее – способа получения и применения соединения формулы (II) или его кристаллической формы.

Предшествующий уровень техники

RAS онкогенные мутации являются наиболее распространенными активирующими мутациями при раке человека, они наблюдаются в 30% случаев опухолей человека. Семейство генов RAS включает три подтипа (KRAS, HRAS и NRAS), из которых 85% случаев RAS-вызванного рака вызваны мутациями в подтипе KRAS. KRAS мутации обычно обнаруживаются в солидных опухолях, таких как аденокарцинома легкого, рак протоков поджелудочной железы и колоректальный рак, и т.д. В опухолях с мутациями KRAS 80% онкогенных мутаций наблюдаются в кодоне 12, и наиболее распространенные мутации включают: p.G12D (41%), p.G12V (28%) и p.G12C (14%).

Полное название гена KRAS – гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен. KRAS играет важную роль в сигнальном регулировании роста клеток. Рецепторы на поверхности клетки, такие как EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), ErbB3 и ErbB4, после получения внешнего сигнала передают сигнал далее через белок RAS. Когда KRAS белок неактивирован, он прочно связывается с ГДФ (гуанозиндифосфатом). После активации фактором обмена гуанозинового нуклеотида, таким как SOS1, KRAS белок связывается с ГТФ (гуанозинтрифосфатом) и становится активной формой киназы. После мутации ген KRAS может независимо передать сигналы к росту и пролиферации далее по сигнальному пути, независимо от сигналов рецепторов фактора роста, расположенных ранее в сигнальном пути, это приводит к неконтролируемому росту клеток и развитию опухоли. Таким образом, наличие мутаций в KRAS гене является также важным индикатором для прогноза развития опухоли.

Хотя KRAS является первым открытым онкогеном, он долго считался мишенью, не поддающейся медикаментозному воздействию. К 2019 году Amgen и Mirati Therapeutics последовательно опубликовали результаты клинических исследований их низкомолекулярных KRAS ингибиторов AMG510 и MRTX849, которые впервые

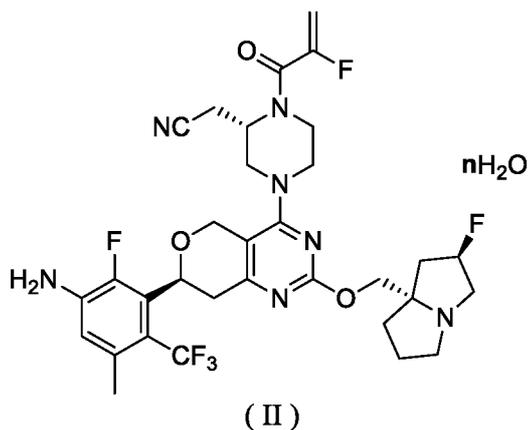
подтвердили клиническую эффективность KRAS ингибиторов в клиническом лечении опухолей. AMG 510 и MRTX849 оба представляют собой необратимые низкомолекулярные ингибиторы, которые подавляют активность KRAS путем образования необратимых ковалентных связей с цистеиновыми остатками мутантного белка KRAS G12C.

KRAS играет важнейшую роль в регуляции сигналов клеточного роста. Рецепторы на поверхности клетки, такие как EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), ErbB3 и ErbB4, после получения внешних сигналов передают сигнал дальше через RAS белок. Когда KRAS белок не активирован, он прочно связан с ГДФ (гуанозин дифосфатом). После активации фактором обмена гуанозина, таким как SOS1, KRAS белок связывается с ГТФ (гуанозин трифосфатом) и переходит в активное состояние киназы. KRAS является важным представителем RAS белков. После мутации гена, KRAS может независимо передавать сигналы к росту и пролиферации далее по сигнальным путям, вне зависимости от входящих сигналов от рецепторов фактора роста, что вызывает неконтролируемый рост клеток и прогрессирование опухоли. Поэтому наличие или отсутствие мутаций в гене KRAS также является важным индикатором для прогноза развития опухоли.

Статистика показывает, что 12-36% случаев аденокарциномы легких запускается мутациями KRAS; 27-56% случаев рака толстой кишки запускается мутациями KRAS; и 90% случаев рака поджелудочной железы, 21% случаев рака эндометрия и 12-36% случаев аденокарциномы легких запускается мутациями KRAS, а это означает огромное число потенциальных пациентов. При мутациях гена KRAS 97% мутаций происходит по аминокислотному остатку в положении 12 или 13, из которых мутации G12D, G12V и G13D плохо поддаются воздействию лекарств, а мутация KRAS (G12C), при которой глицин в положении 12 заменен на цистеин, является перспективным направлением для разработки ковалентных ингибиторов.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении описано соединение формулы (II)



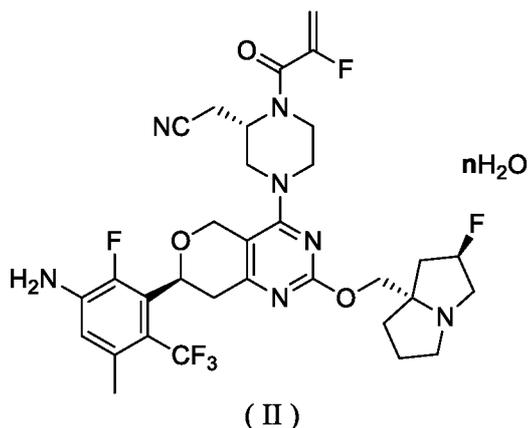
где n выбран из чисел от 0 до 3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n выбран из 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 и 3.0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n выбран из 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 и 3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n равен 2.

В настоящем изобретении описано также соединение формулы (II),



где n выбран из чисел от 0 до 2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n выбран из 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 и 2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n выбран из 0.5, 1, 1.5 и 2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, n равен 2.

В настоящем изобретении описана также кристаллическая форма А соединения формулы (II), характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $8.514\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$ и $18.122\pm 0.200^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, описанная выше кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $6.218\pm 0.200^\circ$, $8.514\pm 0.200^\circ$, $12.299\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$, $16.903\pm 0.200^\circ$, $18.122\pm 0.200^\circ$, $18.927\pm 0.200^\circ$ и $25.580\pm 0.200^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, описанная выше кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $6.218\pm 0.200^\circ$, $8.514\pm 0.200^\circ$, $11.663\pm 0.200^\circ$, $12.299\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$, $16.903\pm 0.200^\circ$, $18.122\pm 0.200^\circ$,

18.927±0.200°, 19.364±0.200°, 20.386±0.200°, 21.914±0.200° и 25.580±0.200°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, описанная выше кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ 6.218±0.200°, 8.514±0.200°, 11.663±0.200°, 12.299±0.200°, 14.689±0.200°, 16.903±0.200°, 18.122±0.200°, 18.927±0.200°, 19.364±0.200°, 20.386±0.200°, 21.914±0.200°, 22.640±0.200°, 25.580±0.200°, 25.988±0.200°, 27.147±0.200° и 27.715±0.200°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, описанная выше кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ 6.218°, 8.514°, 11.663°, 12.299°, 14.689°, 16.903°, 18.122°, 18.554°, 18.927°, 19.364°, 20.386°, 21.914°, 22.640°, 23.867°, 24.553°, 24.806°, 25.580°, 25.988°, 27.147°, 27.715°, 29.135° и 31.799°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, описанная выше кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ 8.514±0.200° и 14.689±0.200°, а также опционально при значениях углов 2θ 6.218±0.200°, и/или 11.663±0.200°, и/или 12.299±0.200°, и/или 16.903±0.200°, и/или 18.122±0.200°, и/или 18.554±0.200°, и/или 18.927±0.200°, и/или 19.364±0.200°, и/или 20.386±0.200°, и/или 21.914±0.200°, и/или 22.64±0.200°, и/или 23.867±0.200°, и/или 24.553±0.200°, и/или 24.806±0.200°, и/или 25.58±0.200°, и/или 25.988±0.200°, и/или 27.147±0.200°, и/или 27.715±0.200°, и/или 29.135±0.200°, и/или 31.799±0.200°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раскрыта описанная выше кристаллическая форма А, имеющая XRPD диаграмму, изображенную на фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, данные порошковой рентгеновской дифрактограммы (XRPD) описанной выше кристаллической формы А такие, как показано в таблице 1:

Таблица 1

№	Угол 2θ (°)	D-расстояние (Å)	Отн. интенсивность (%)	Интенсивность	№	Угол 2θ (°)	D-расстояние (Å)	Отн. интенсивность (%)	Интенсивность
1	6.218	14.20235	49.70%	1417.41	18	24.806	3.58629	6.50%	343.087
2	8.514	10.37753	53.00%	1500.55	19	25.580	3.47959	44.40%	1327.10
3	11.663	7.58177	27.40%	865.097	20	25.988	3.42591	11.80%	473.421
4	12.299	7.19077	36.40%	1111.73	21	27.147	3.28222	12.90%	486.080
5	12.888	6.86372	3.20%	251.582	22	27.715	3.21613	9.70%	395.792
6	14.689	6.02570	100.00%	2804.39	23	28.521	3.12708	4.30%	249.149
7	16.255	5.44860	2.80%	288.118	24	29.135	3.06256	8.00%	344.276

8	16.903	5.24119	48.50%	1486.90	25	29.638	3.01175	2.10%	183.706
9	18.122	4.89132	73.90%	2150.25	26	30.569	2.92211	3.20%	206.383
10	18.554	4.77818	23.10%	823.078	27	31.125	2.87113	3.10%	202.852
11	18.927	4.68486	44.30%	1370.18	28	31.799	2.81180	5.30%	256.503
12	19.364	4.58024	21.10%	758.954	29	32.789	2.72916	1.20%	139.579
13	20.386	4.35286	17.50%	640.608	30	33.855	2.64562	2.60%	169.028
14	21.914	4.05261	24.20%	803.125	31	34.827	2.57393	1.40%	129.355
15	22.640	3.92439	9.60%	421.049	32	36.782	2.44153	4.80%	216.242
16	23.867	3.72533	6.30%	335.668	33	38.522	2.33512	1.60%	124.831
17	24.553	3.62272	5.40%	315.159	34	39.646	2.27149	1.40%	126.875

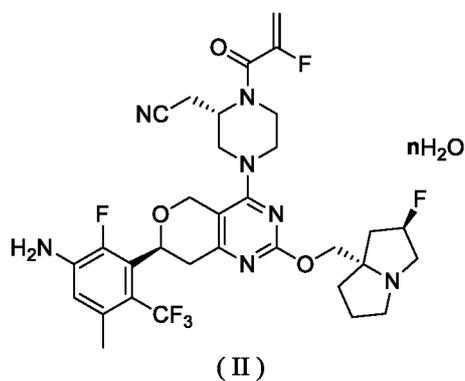
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, диаграмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) описанной выше кристаллической формы А имеет эндотермический пик при $115.37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, диаграмма ДСК описанной выше кристаллической формы А такая, как показано на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, диаграмма термогравиметрического анализа (ТГА) описанной выше кристаллической формы А показывает потерю веса до 5.379% при $150.0 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, диаграмма ТГА описанной выше кристаллической формы А такая, как показано на фиг. 3.

В настоящем изобретении описан также способ получения кристаллической формы А соединения формулы (II), включающий:



(a) добавление соединения формулы (I) в этанол и перемешивание полученной смеси до прозрачности;

(b) медленное добавление в систему воды при перемешивании и добавление затравочных кристаллов при температуре от 20 до 30°C ;

(c) перемешивание при температуре от 20 до 30°C в течение 15 часов;

(d) медленное добавление воды по каплям в реакционную смесь при температуре от 20 до 30°C и дальнейшее перемешивание в течение 1 - 3 часов;

(e) фильтрование и отделение твердого осадка.

В настоящем изобретении описано также применение описанного выше

соединения и его кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения солидных опухолей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутые выше солидные опухоли представляют собой рак легкого и рак прямой кишки.

Технический эффект

Соединение по настоящему изобретению обладает хорошей активностью в ингибировании пролиферации клеток KRASG12C-мутантной линии MIA-PA-CA-2 и клеток NCI-H358. Соединение по настоящему изобретению обладает хорошей стабильностью в микросомах печени, гепатоцитах, плазме крови и цельной крови, а также имеют хорошие фармакокинетические параметры и оказывают существенное противоопухолевое действие. Кристаллическая форма А стабильна, менее чувствительна к свету и теплу, и имеет хорошие фармакокинетические характеристики.

Определения

Если не указано иное, применяющиеся в настоящем тексте термины и выражения имеют указанные ниже значения. Конкретные термины или выражения не должны считаться неопределенными или непонятными при отсутствии специально данного определения, а должны пониматься в их общепринятом значении. Когда в настоящем тексте указано торговое название, это означает соответствующий материал или его активный компонент.

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

Химические реакции в частных вариантах осуществления настоящего изобретения проводят в подходящем растворителе, который должен подходить для химических превращений по настоящему изобретению и для использующихся реагентов и материалов. Для получения соединения по настоящему изобретению квалифицированному специалисту в данной области иногда необходимо модифицировать или выбрать стадии синтеза или схемы реакций на основе имеющихся вариантов осуществления.

Настоящее изобретение будет подробно описано ниже с использованием примеров, которые никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Все использующиеся в настоящем описании растворители являются коммерчески доступными и могут применяться без дополнительной очистки.

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.

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

Метод порошковой рентгеновской дифракции (XRPD), использующийся в настоящей заявке

Модель прибора: Рентгеновский дифрактометр Bruker D2 Phaser X-ray diffractometer

Методика тестирования: примерно 10 – 20 мг образца использовали для проведения XRPD анализа.

Подробные параметры XRPD анализа приведены ниже:

Источник излучения: Cu, k α , ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$).

Напряжение в источнике излучения: 30 кВ, сила тока в источнике излучения: 10 мА

Щель расходимости: 0.60 мм

Щель детектора: 5.827 мм

Антирассеивающая щель: 0 мм

Диапазон сканирования: 3-40 град

Шаг стадии: 0.02 град

Время стадии сканирования: 0.2 сек

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

Модель прибора: NETZSCH DSC 214 DSC21400A-0958-L

Методика тестирования: Образец (около 4.02 мг) помещали в алюминиевую ДСК ячейку для тестирования. В условиях 50 мл/мин потока N₂ нагревали образец с 30°C

(комнатная температура) до 400°C со скоростью нагрева 10°C/мин.

Метод термогравиметрического анализа (ТГА), использующийся в настоящем изобретении

Модель прибора: термогравиметрический анализатор TA Discovery TGA 5500

Методика тестирования: Образец (от 2 до 5 мг) помещали в ТГА платиновую ячейку для тестирования. В условиях 25 мл/мин потока N₂ нагревали образец от комнатной температуры до 350°C или до потери веса 20% со скоростью нагрева 10°C/мин.

Метод монокристаллической рентгеновской дифрактометрии, использующийся в настоящем изобретении

Модель прибора: дифрактометр Bruker D8 VENTURE CMOS Photon II с многослойным монохроматором helios mx.

Методика тестирования: 0.0133г кристаллической формы А соединения формулы (II) растворяли в 2 мл ацетонитрила при комнатной температуре. Раствор образца добавляли в 4-миллилитровую полугерметичную вialу и медленно упаривали при комнатной температуре. Через десять дней были получены большие бесцветные кристаллы. Температура проведения дифракционного исследования составляла T=173(2) К.

Параметры прибора:

Дифрактометр Bruker D8 VENTURE CMOS Photon II с многослойным монохроматором helios mx.

Криогенная система: Oxford Cryostream 800 Cu: $\lambda=1.54184 \text{ \AA}$, 2.5кВт,

Расстояние от кристалла до детектора: d = 45 мм

Напряжение в трубке: 50 кВ

Ток в трубке: 50 мА

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: XRPD диаграмма кристаллической формы А соединения формулы (II), полученная с использованием Cu-K α излучения;

фиг. 2: кривая ДСК кристаллической формы А соединения формулы (II);

фиг. 3: кривая ТГА кристаллической формы А соединения формулы (II);

фиг. 4: изменения объема опухоли с течением времени при разных дозировках соединения формулы (I);

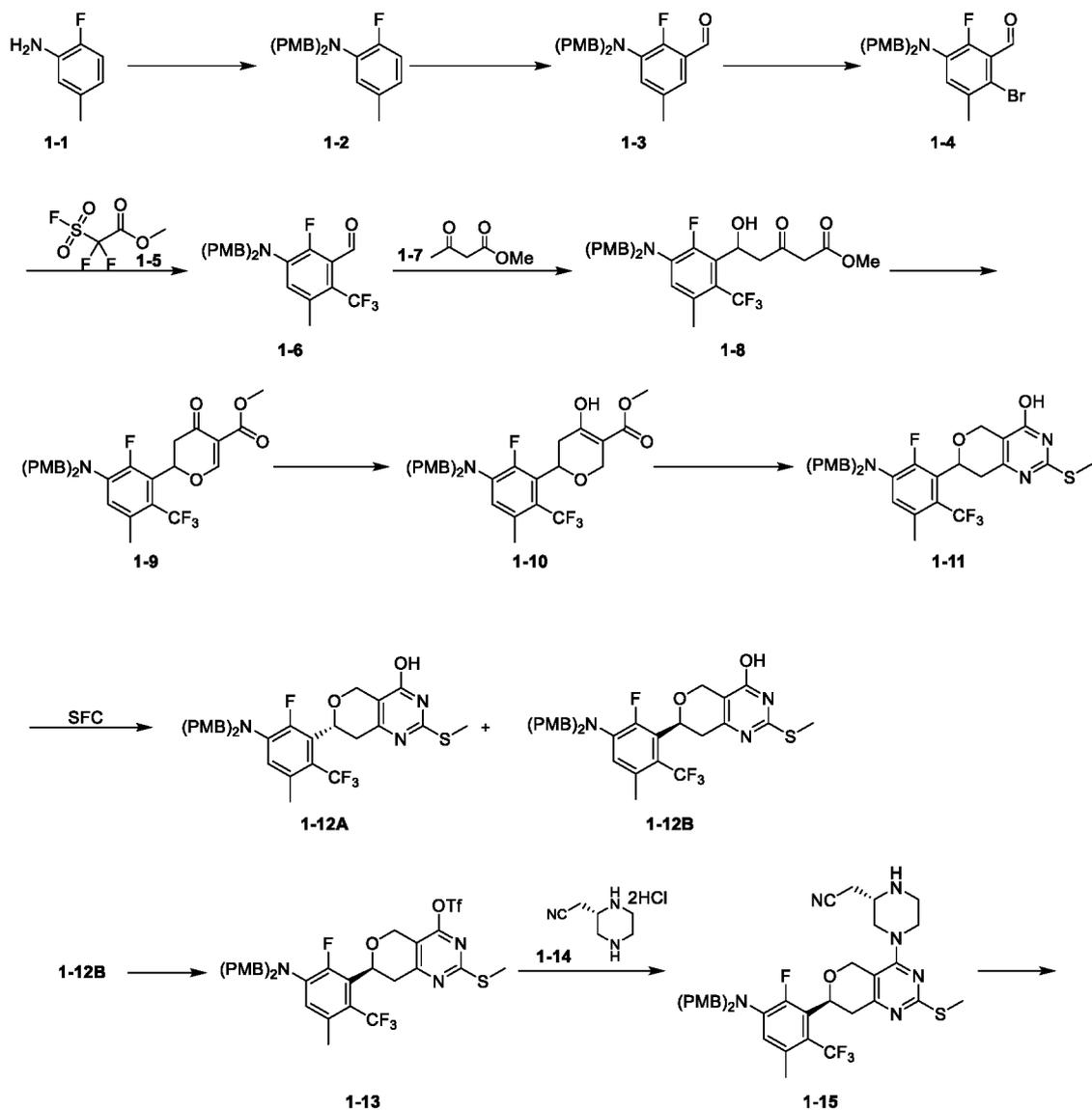
фиг. 5: изменения веса тела животных с течением времени при разных дозировках соединения формулы (I);

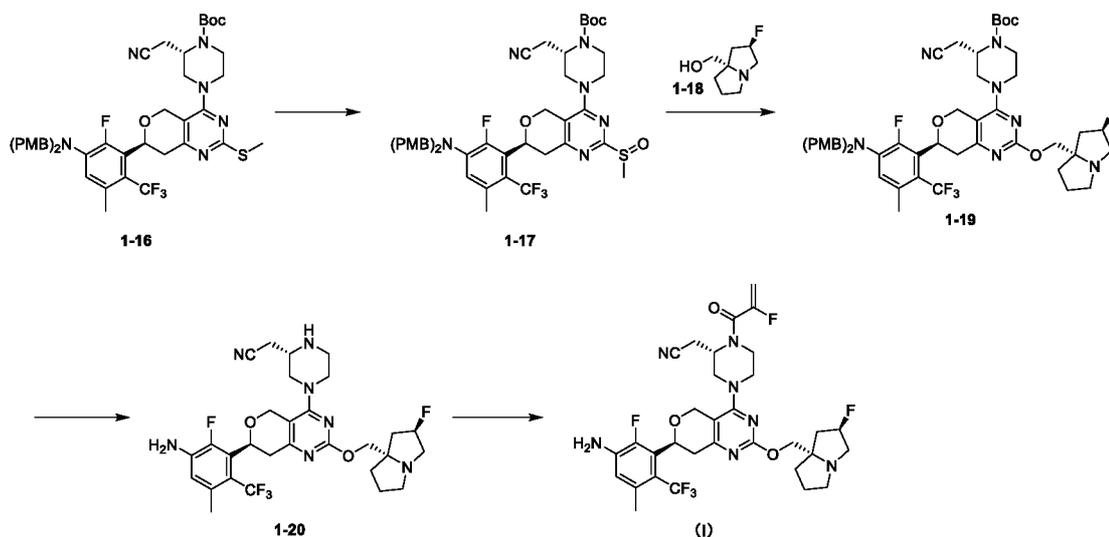
фиг. 6: эллипсоидная диаграмма трехмерной структуры соединения формулы (III), полученная методом монокристаллической рентгеновской дифрактометрии.

Подробное описание изобретения

Для лучшего понимания сути изобретения, настоящая заявка дополнительно проиллюстрирована ниже частными примерами, но описанные частные примеры не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Получение соединения формулы (I)





Стадия 1. Синтез соединения 1-2

Подготавливали 5-литровую трехгорлую колбу, в которую помещали соединение 1-1 (250 г, 2.00 моль, 1 экв.), безводный карбонат калия (690.26 г, 4.99 моль, 2.5 экв.) и иодид калия (331.62 г, 2.00 моль, 1 экв.) в N-метилпирролидоне (2.5 л). Затем добавляли по каплям п-метоксибензил хлорид (641.36 г, 4.10 моль, 557.71 мл, 2.05 экв.), и реакционный раствор становился желтым и мутным. Полученную смесь перемешивали в атмосфере азота в масляной бане при 120°C в течение 5 часов. Объединяли 6 порций реакционного раствора (250×6) и добавляли в 20 литров воды. Затем добавляли 10 литров метил-трет-бутилового эфира, и смесь перемешивали. После разделения слоев отделяли органическую фазу и экстрагировали водную фазу метил-трет-бутиловым эфиром (5 л x 1). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (10 л x 2), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт соединения 1-2. Добавляли в сырой продукт 3 литра петролейного эфира, и полученную смесь суспендировали в течение ночи. Суспензия была молочно-белая и мутная, ее фильтровали через воронку Бюхнера. Осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (500 мл x 3), получая соединение 1-2 из осадка на фильтре. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta = 7.23-7.18$ (м, 4H), 6.91-6.87 (м, 1H), 6.82-6.76 (м, 4H), 6.65 -6.59 (м, 2H), 4.20 (с, 4H), 3.79 (с, 6H), 2.19 (с, 3H). LCMS: MS $m/z = 366.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 2. Синтез соединения 1-3

2,2,6,6-тетраметилпиперидин (2.44 кг, 17.29 моль, 2.94 л, 4 экв.) добавляли в безводный тетрагидрофуран (15 л), и полученную смесь охлаждали до температуры от -5 до 0°C. Реакционную систему продували азотом три раза и добавляли по каплям н-бутиллитий (2.5 M, 6.92 л, 4 экв.) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при температуре от -5 до 0°C в течение 15 минут и охлаждали до -60°C. Добавляли по

каплям раствор соединения 1-2 (1.58 кг, 4.32 моль, 1 экв.) в тетрагидрофуране (1.5 л). После окончания прикапывания смесь перемешивали при температуре от -65 до -60°C в течение 0.5 часа. Затем быстро добавляли N,N-диметилформамид (3.16 кг, 43.24 моль, 3.33 л, 10 экв.), и полученную смесь перемешивали при -60°C в течение 10 минут. Добавляли в реакционный раствор 20 л насыщенного раствора хлорида аммония, и полученную смесь экстрагировали 5 литрами метил-трет-бутилового эфира. Слои разделяли. Органическую фазу промывали 20 литрами насыщенного раствора хлорида аммония. Затем водную фазу экстрагировали 10 литрами метил-трет-бутилового эфира. Слои разделяли. Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (12 л x 2), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. Затем сырой продукт перемешивали с петролейным эфиром и метил-трет-бутиловым эфиром (3/1, 3 л) в течение 5 часов и затем фильтровали. Осадок на фильтре собирали, получая соединение 1-3. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta = 10.43 - 10.35$ (м, 1H), 7.21-7.18 (м, 5H), 6.92 - 6.81 (м, 5H), 4.25 (с, 4H), 3.80 (с, 6H), 2.23 (с, 3H). LCMS:MS $m/z = 394.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 3. Синтез соединения 1-4

Соединение 1-3 (1.17 кг, 2.83 моль, 95% чистота, 1 экв.) добавляли в N,N-диметилформамид (5.7 л) и порциями добавляли бромсукцинимид (603.35 г, 3.39 моль, 1.2 экв.) при 5°C . Реакционную смесь перемешивали при температуре от 5 до 15°C в течение 1 часа. Медленно добавляли в реакционный раствор 5.7 л воды, при этом выпадал твердый осадок. После 20 минут перемешивания медленно добавляли 11.4 л воды. Реакционную смесь перемешивали еще 40 минут и фильтровали. Осадок на фильтре промывали водой (2 л x 2). Сырой продукт перемешивали с 7.7 л смеси петролейного эфира и метил-трет-бутилового эфира (10:1) в течение 12 часов и затем фильтровали. Осадок на фильтре промывали 500 мл смеси петролейного эфира и метил-трет-бутилового эфира (10:1). После упаривания в вакууме продукт продували азотом в течение 12 часов, получая соединение 1-4. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta = 10.39$ (с, 1H), 7.17 (д, $J = 8.8$ Гц, 4H), 6.89 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H), 6.85-6.82 (м, 4H), 4.22 (с, 4H), 3.79 (с, 6H), 2.28 (с, 3H). LCMS:MS $m/z = 472.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 474.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 4. Синтез соединения 1-6

Соединение 1-4 (130 г, 275.22 ммоль, 1 экв.), кетон иодид (104.83 г, 550.44 ммоль, 2 экв.) и соединение 1-5 (264.37 г, 1.38 моль, 175.08 мл, 5 экв.) растворяли в ДМФА (1.3 л). Смесь перемешивали при 100°C в атмосфере азота 4 часа. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали и выливали в воду (1.3 л) для остановки реакции. Реакционную смесь экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (400 мл x 2), промывали насыщенным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и

фильтровали. Маточный раствор собирали и упаривали, получая сырой продукт. Сырой продукт перемешивали с петролейным эфиром и метил-трет-бутиловым эфиром (8/1, 300 мл), получая соединение 1-6. Маточный раствор собирали, упаривали и очищали методом колоночной хроматографии (петролейный эфир/этилацетат = от 100/1 до 5/1), получая сырой продукт. Сырой продукт перемешивали с петролейным эфиром и метил-трет-бутиловым эфиром (8/1, 100 мл), получая соединение 1-6. Две партии твердого продукта смешивали, суспендировали в петролейном эфире и фильтровали. Твердый продукт собирали, получая соединение 1-6. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ = 10.37 (кв, J = 4.0 Гц, 1H), 7.18 - 7.11 (м, 4H), 6.89 - 6.82 (м, 4H), 6.73 (д, J = 8.8 Гц, 1H), 4.36 (с, 4H), 3.81 (с, 6H), 2.37 - 2.29 (м, 3H). LCMS: MS m/z = 484.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Стадия 5. Синтез соединения 1-8

Гидрид натрия (70.21 г, 1.76 моль, 60% чистота, 1.8 экв.) добавляли в безводный тетрагидрофуран (4.5 л) и охлаждали до -5°C . Реакционную смесь продували азотом три раза и добавляли по каплям соединение 1-7 (203.82 г, 1.76 моль, 188.72 мл, 1.8 экв.) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при температуре от -5 до 0°C в течение 10 минут, затем добавляли по каплям *n*-бутиллитий (2.5 М, 702.14 мл, 1.8 экв.). Реакционную смесь перемешивали при температуре от -5 до 0°C в атмосфере азота еще 10 минут и охлаждали до -10°C . Добавляли по каплям раствор соединения 1-6 (450 г, 975.19 ммоль, 1 экв.) в тетрагидрофуране (450 мл), и полученную смесь перемешивали при -10°C в течение 10 минут. Реакционный раствор медленно добавляли в 5 л насыщенного раствора хлорида аммония для экстракции. Слои разделяли. Органическую фазу промывали 4 л насыщенного раствора хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. Добавляли 900 мл x 4 петролейного эфира в упаренный сырой продукт, промывая при встряхивании. Надосадочный петролейный эфир сливали, и сырой продукт сушили в вакууме, получая соединение 1-8. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ = 7.18-7.15 (м, 4H), 6.90 - 6.78 (м, 4H), 6.61 (д, J = 8.8 Гц, 1H), 5.72 - 5.57 (м, 1H), 4.31 (м, 4H), 3.81 (с, 6H), 3.76(с, 3H), 3.56 (с, 2H), 3.50 - 3.38 (м, 1H), 2.98 - 2.93 (м, 1H), 2.38 - 2.26 (м, 3H). LCMS: MS m/z = 578.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 6. Синтез соединения 1-9

Соединение 1-8 (1.15 кг, 1.77 моль, 89% чистота, 1 экв.) добавляли в дихлорметан (5.7 л) и добавляли диметилацеталь *N,N*-диметилформамида (337.86 г, 2.84 моль, 376.66 мл, 1.6 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и охлаждали до 0°C . Добавляли по каплям комплекс трифторид бора-диэтиловый эфир (377.27 г, 2.66 моль, 328.06 мл, 1.5 экв.) при температуре от 0 до 5°C , и полученную смесь перемешивали в течение 10 минут. Согласно LCMS анализу, исходные вещества исчезали, и в масс-

спектре появлялся сигнал продукта. Реакционный раствор медленно добавляли в 10 л полунасыщенного раствора бикарбоната натрия для экстракции. Слои разделяли. Органическую фазу промывали 5 литрами насыщенного раствора хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. Сырой продукт разделяли на шесть равных частей, и в каждую часть добавляли 0.83 л метил-трет-бутилового эфира. Смесь перемешивали 20 минут, при этом выпадал твердый осадок. Добавляли 0.5 л смеси петролейного эфира и метил-трет-бутилового эфира (1:1), и полученную смесь перемешивали 16 часов. Все шесть частей фильтровали вместе. Осадок на фильтре промывали смесью петролейного эфира и метил-трет-бутилового эфира (1:1, 800 мл x 2) и упаривали на роторном испарителе досуха. Маточный раствор очищали методом колоночной хроматографии (петролейный эфир:этилацетат = от 100:0 до 0:1), получая соединение 1-9. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ = 8.43 (д, J = 0.8 Гц, 1H), 7.21 - 7.10 (м, 4H), 6.91 - 6.81 (м, 4H), 6.70 (д, J = 8.8 Гц, 1H), 5.93 (дд, J = 3.2, 14.8 Гц, 1H), 4.35 (с, 4H), 3.8(с, 3H), 3.81 (с, 6H), 3.38-3.29 (м, 1H), 2.68 (дд, J = 3.6, 16.8 Гц, 1H), 2.39 - 2.24 (м, 3H). LCMS: MS m/z = 588.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 7. Синтез соединения 1-10

Соединение 1-9 (775 г, 1.32 моль, 1 экв.) добавляли в тетрагидрофуран (4 л). Реакционную смесь охлаждали до -60°C и продували азотом три раза. Затем добавляли по каплям три-втор-бутилборгидрид (1M, 1.45 L, 1.1 экв.) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при -60°C в течение 10 минут. Реакционный раствор медленно добавляли в 3.5 литра 1M раствора соляной кислоты и добавляли 2 л воды для экстракции. Слои разделяли. Водную фазу дополнительно экстрагировали 2 литрами этилацетата. Органические фазы объединяли и добавляли 1 л этилацетата. Реакционную смесь промывали 5 л насыщенного раствора хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. Сырой продукт делили на 4 части и добавляли в каждую часть 200 мл метил-трет-бутилового эфира. Смесь перемешивали 10 минут и медленно добавляли 200 мл петролейного эфира. После 0.5-1 часа перемешивания выпадал твердый осадок. Добавляли порциями 1.6 л петролейного эфира, и полученную смесь перемешивали 12 часов. Полученную суспензию фильтровали, и осадок на фильтре промывали 3 раза по 300 мл смеси петролейного эфира и метил-трет-бутилового эфира (10:1). Твердый продукт собирали, получая соединение 1-10 (1.15 кг). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ = 7.167-7.14 (м, 4H), 6.87-6.83 (м, 4H), 6.63 (д, J = 8.8 Гц, 1H), 5.05-5.00 (м, 1H), 4.61-4.58 (м, 1H), 4.42 - 4.24 (м, 5H), 3.85-3.73 (м, 10H), 3.13-3.05 (м, 1H), 2.47 - 2.38 (м, 1H), 2.35-2.31 (м, 3H). LCMS: MS m/z = 590.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 8. Синтез соединения 1-11

Соединение 1-10 (310 г, 525.80 ммоль, 1 экв.) добавляли в этанол (1.55 л). Затем добавляли сульфат S-метилизомочевины (439.11 г, 1.58 моль, 3 экв.) и карбонат натрия (111.46 г, 1.05 моль, 2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при температуре от 45 до 50°C (внутренняя температура) в атмосфере азота 16 часов. Большую часть этанола упаривали. Добавляли в сырой продукт 500 мл воды и 400 мл этилацетата. Смесь перемешивали и доводили до pH 3 - 4 добавлением 500 мл 1М раствора соляной кислоты. Выпадал почти белый твердый осадок. Добавляли затем 600 мл петролейного эфира. При перемешивании выпадало большое количество почти белого твердого осадка. Реакционную смесь фильтровали через воронку Бюхнера и промывали осадок на фильтре этилацетатом (200 мл x 2), получая продукт в виде осадка на фильтре. Осадок на фильтре растворяли в 2 литрах дихлорметана. После разделения слоев органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, получая соединение 1-11. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 7.22 - 7.14 (м, 4H), 6.91 - 6.82 (м, 4H), 6.65 (дд, J = 8.4 Гц 1H), 5.12-5.08 (м, 1H), 4.97-4.91 (м, 1H), 4.67 - 4.57 (м, 1H), 4.45 - 4.22 (м, 4H), 3.88 - 3.74 (м, 6H), 3.43-3.35 (м, 1H), 2.77-2.72 (м, 1H), 2.59 (м, 3H), 2.40-2.31 (м, 3H). LCMS:MS m/z = 630.2 [M+H]⁺.

Стадия 9. Синтез соединения 1-12B

Соединение 1-11 выделяли методом сверхкритической флюидной хроматографии (SFC) (колонка: DAICEL CHIRALPAK AD (250мм*50мм, 10мкм); подвижная фаза: [0.1%NH₃. H₂O EtOH]; EtOH%: 45%-45%, 6.3 мин), получая соединение 1-12B (пик: 1.665 мин) и соединение 1-12A (пик: 2.446 мин).

Стадия 10. Синтез соединения 1-13

Соединение 1-12B (2 г, 3.18 ммоль, 1 экв.) растворяли в дихлорметане (20 мл) и добавляли N,N-диизопропилэтиламин (1.23 г, 9.53 ммоль, 1.66 мл, 3 экв.). Реакционную смесь охлаждали до температуры от 0 до 10°C и медленно добавляли в систему ангидрид трифторметансульфокислоты (1.34 г, 4.76 ммоль, 786.11 мкл, 1.5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 15 минут. Добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония (15 мл). После разделения слоев водную фазу экстрагировали дихлорметаном (15 мл x 2). Органические фазы объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, получая сырой продукт. Сырой продукт разделяли методом колоночной хроматографии (петролейный эфир/этилацетат = от 100/1 до 0/1), получая соединение 1-13. LCMS m/z = 762.2 [M+H]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 7.21 - 7.11 (м, 4H), 6.90 - 6.80 (м, 4H), 6.66 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 5.19-5.15 (м, 1H), 5.04 - 4.93 (м, 1H), 4.77-4.72 (м, 1H), 4.41 - 4.19 (м, 4H), 3.80 (с, 6H), 3.62-3.54 (м, 1H), 3.11

- 2.97 (м, 1H), 2.56 (с, 3H), 2.42 - 2.31 (м, 3H). LCMS:MS $m/z = 762.2 [M+H]^+$.

Стадия 11. Синтез соединения 1-15

Соединение 1-13 (147 г, 186.74 ммоль, 96.767% чистота, 1 экв.) растворяли в N,N-диметилформамиде (1.5 л). Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (72.40 г, 560.23 ммоль, 97.58 мл, 3 экв.) и затем добавляли соединение 1-14 (42.54 г, 214.76 ммоль, 1.15 экв, 2HCl). Реакционную смесь нагревали до 50°C и перемешивали 0.5 часа, получая раствор соединения 1-15 в N,N-диметилформамиде. Реакционный раствор напрямую использовали в следующей стадии.

Стадия 12. Синтез соединения 1-16

Раствор соединения 1-15 (137.8 г, 187.02 ммоль, 1 экв.) в N,N-диметилформамиде (1.5 л) помещали в реактор и при перемешивании добавляли триэтиламин (18.92 г, 187.02 ммоль, 26.03 мл, 1 экв.). Затем добавляли в реакционный раствор ди-трет-бутилдикарбонат (48.98 г, 224.42 ммоль, 51.56 мл, 1.2 экв.), и смесь перемешивали при 18°C в течение 10 часов. Выливали смесь в воду (1.5 л), добавляли этилацетат (400 мл x 3) и насыщенный водный раствор хлорида аммония (400 мл x 4). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, получая соединение 1-16. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) $\delta = 7.16$ (д, $J = 8.4$ Гц, 4H), 6.85 (д, $J = 8.6$ Гц, 4H), 6.64 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H), 5.22 (д, $J = 7.2$ Гц, 1H), 4.90 - 4.68 (м, 2H), 4.61 (с, 1H), 4.41 - 4.21 (м, 4H), 4.04 (с, 1H), 3.80 (с, 6H), 3.71 (с, 1H), 3.50 (д, $J = 11.0$ Гц, 2H), 3.30 (с, 1H), 3.24 - 3.02 (м, 2H), 2.90 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H), 2.78 - 2.58 (м, 2H), 2.55 (с, 3H), 2.34 (д, $J = 4.0$ Гц, 3H), 1.51 (с, 9H). LCMS $m/z = 837.2 [M+H]^+$.

Стадия 13. Синтез соединения 1-17

Соединение 1-16 (245 г, 278.10 ммоль, 95% чистота, 1 экв.) растворяли в безводном дихлорметане (2500 мл) и охлаждали до температуры от 0 до 10°C. Затем порциями добавляли м-хлорпероксибензойную кислоту (56.46 г, 278.10 ммоль, 85% чистота, 1 экв.), и смесь перемешивали при 10°C в течение 0.5 часа. Добавляли дополнительное количество м-хлорпероксибензойной кислоты (8.47 г, 41.71 ммоль, 85% чистота, 0.15 экв.), и смесь перемешивали при 10°C еще 0.5 часа. Эту реакционную смесь обрабатывали вместе с реакционной смесью на 10 г соединения 1-16. Реакционный раствор промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (1500 мл), 5%-ным раствором тиосульфата натрия (1500 мл) (после проведения теста с увлажненной тестовой полоской крахмал-йодид калия) и полунасыщенным раствором хлорида натрия (1500 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, упаривали и очищали методом колоночной хроматографии (этилацетат:петролейный эфир = 10%-15%-20%-30%), получая соединение 1-17. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ м.д. 7.15 (д, $J = 8.00$ Гц,

4 Н), 6.85 (д, J = 8.80 Гц, 4 Н), 6.65 (д, J = 8.80 Гц, 1 Н), 5.27 (м, 1 Н), 4.78 - 4.91 (м, 2 Н), 4.61 (с, 1 Н), 4.24 - 4.38 (м, 4 Н), 3.90 - 4.18 (м, 2 Н), 3.78 - 3.82 (м, 6 Н), 3.42 - 3.70 (м, 3 Н), 3.33 (ушир.с, 1 Н), 3.06 - 3.28 (м, 2 Н), 2.90 (с, 3 Н), 2.66 (м, 2 Н), 2.29 - 2.41 (с, 3 Н), 1.51 (с, 9 Н). LCMS m/z = 853.2[M+H]⁺.

Стадия 14. Синтез соединения 1-19

Соединение 1-18 (18.24 г, 114.59 ммоль, 1.2 экв.) растворяли в безводном тетрагидрофуране (900 мл), и полученную смесь охлаждали до -20°C. Затем добавляли трет-бутоксид натрия (11.01 г, 114.59 ммоль, 1.2 экв.), и смесь перемешивали в течение 15 минут. Затем добавляли раствор соединения 1-17 (90.5 г, 95.49 ммоль, 90% чистота, 1 экв.) в безводном тетрагидрофуране (180 мл), и полученную смесь перемешивали еще 0.5 ч. Эту реакционную смесь обрабатывали вместе с реакционной смесью на 50 г соединения 1-18. Добавляли в реакционный раствор 1000 мл насыщенного раствора хлорида аммония для остановки реакции. После разделения слоев водную фазу экстрагировали этилацетатом (1000 мл). Слои разделяли. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, упаривали и очищали методом колоночной хроматографии (этилацетат:петролейный эфир = 20%-50%-100%), получая соединение 1-19 в виде белого твердого вещества. LCMS m/z = 948.4 [M+H]⁺.

Стадия 15. Синтез соединения 1-20

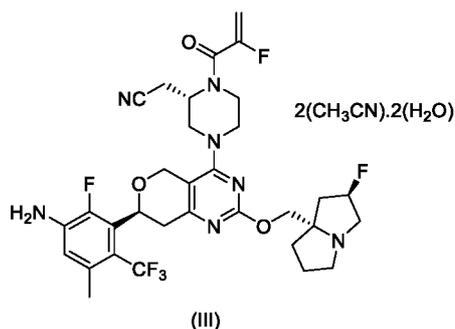
Соединение 1-19 (97.00 г, 97.20 ммоль, 95% чистота, 1 экв.) растворяли в 2-метилтетрагидрофуране (500 мл), и полученную смесь охлаждали до 0°C. Затем добавляли по каплям соляную кислоту (8 М, 614.80 мл, 50.6 экв.) в реакционный раствор, полученную смесь нагревали до 25°C и перемешивали 2 часа. Затем добавляли н-гептан (200 мл), и слои разделяли. Водную фазу отделяли и добавляли 2-метилтетрагидрофуран (300 мл). рН смеси доводили до 8 - 9 добавлением карбоната натрия, и смесь перемешивали до прозрачности. После разделения слоев отделяли органическую фазу и экстрагировали водную фазу 2-метилтетрагидрофураном (300 мл x 2). Органическую фазу отделяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (200 мл), сушили над безводным сульфатом магния и фильтровали. Органическую фазу собирали и упаривали, получая сырой продукт. Сырой продукт растворяли в дихлорметане (1000 мл) и медленно добавляли трифторуксусную кислоту (283.73 г, 2.49 моль, 184.24 мл, 25.6 экв.), поддерживая температуру ниже 10°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Реакционный раствор выливали в 500 мл ледяной воды, и смесь перемешивали до прозрачности. После разделения слоев органическую фазу экстрагировали водой (300 мл x 3). Две порции водной фазы объединяли и затем экстрагировали дихлорметаном (500 мл x 4). Органическую фазу отбрасывали. Водную фазу охлаждали до 10°C, добавляли 500 мл

2-метилтетрагидрофурана (при этом выделялось тепло). Затем рН смеси довели до 9 добавлением карбоната натрия и добавляли 2-метилтетрагидрофуран (400 мл x 2) для экстракции. Органические фазы объединяли, промывали последовательно водой (300 мл x 4) и насыщенным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, получая соединение 1-20 в виде серого твердого вещества. LCMS $m/z = 608.27 [M+H]^+$.

Стадия 16. Синтез соединения формулы (I)

Соединение 1-20 (58 г, 84.00 ммоль, 88% чистота, 1 экв.), N,N-диизопропилэтиламин (21.71 г, 168.00 ммоль, 29.26 мл, 2 экв.) и 2-(7-азабензотриазол)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (38.33 г, 100.80 ммоль, 1.2 экв.) растворяли в ДМФА (600 мл), и реакционную смесь охлаждали до 0°C. Порциями добавляли 2-фторакриловую кислоту (6.81 г, 75.60 ммоль, 0.9 экв.), и смесь перемешивали при 0°C в течение 10 минут. Реакционный раствор выливали в 900 мл воды и затем экстрагировали этилацетатом (200 мл x 3). Органические фазы объединяли, последовательно промывали насыщенным раствором хлорида аммония (200 мл x 3), насыщенным раствором карбоната натрия (200 мл x 3) и насыщенным раствором хлорида натрия (200 мл), и затем сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали. После этого полученную смесь перемешивали с ацетонитрилом и водой (100 мл: 150 мл) в течение 16 часов. Полученную суспензию фильтровали, получая соединение формулы (I). Анализ методом сверхкритической флюидной хроматографии (колонка: Chiralcel OD-3, 50×4.6мм, 3мкм, подвижная фаза: А (СО₂) и В (метанол, содержащий 0.05% диизопропиламина); градиент: В% = от 5 до 50%, 3 мин; скорость потока: 3.4 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 1800 фунт/кв.дюйм, оптическая чистота: 99.21%, пик: 1.840 мин). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) $\delta = 6.80 - 6.68$ (м, 1H), $5.73 - 5.51$ (м, 1H), $5.46 - 5.19$ (м, 3H), $5.05 - 4.90$ (м, 3H), $4.74 - 4.58$ (м, 2H), $4.37 - 4.26$ (м, 1H), $4.20 - 4.06$ (м, 2H), $4.05 - 3.84$ (м, 3H), $3.79 - 3.59$ (м, 2H), $3.54 - 3.43$ (м, 1H), $3.42 - 3.35$ (м, 1H), $3.31 - 3.24$ (м, 1H), $3.13 - 2.89$ (м, 3H), $2.82 - 2.52$ (м, 2H), $2.50 - 2.42$ (м, 1H), $2.41 - 2.30$ (м, 5H), $2.29 - 2.18$ (м, 1H).

Пример 2. Анализ соединения формулы (III) методом монокристаллической рентгеновской дифрактометрии



0.0133 г кристаллической формы А соединения формулы (II) растворяли в 2 мл ацетонитрила при комнатной температуре. Раствор образца добавляли в 4-миллилитровую полужакрытую виалу и медленно упаривали при комнатной температуре. Через десять дней были получены большие бесцветные кристаллы. Кристаллы собирали и получали данные интенсивности дифракции с использованием рентгеновского дифрактометра (D8-VENTURE). Данные по кристаллической структуре соединения формулы (III) приведены в таблице 2, и эллипсоидная диаграмма трехмерной структуры соединения формулы (III) показана на фиг. 6.

Таблица 2. Данные по кристаллической структуре соединения формулы (III)

Размер кристалла	0.180 x 0.160 x 0.120 мм
Тип излучения	Cu K α ($\lambda = 1.54184\text{\AA}$)
Кристаллическая система	Тетрагональная
Пространственная группа	P4(1)
Размер ячейки	a = 10.9496(3) \AA b = 10.9496(3) \AA c = 64.126(2) \AA $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Объем ячейки	V = 7688.3 (5) \AA^3
Единиц в ячейке	Z = 8
Плотность кристалла	$D_c = 1.375 \text{ Мг/м}^3$
F(000) кристалла	3328
Коэффициент поглощения μ	$\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.971 \text{ мм}^{-1}$
Лимитирующие индексы	-12 $\leq h \leq 12$ -9 $\leq k \leq 12$ -75 $\leq l \leq 73$
Температура эксперимента	T = 173 (2) К.
Диапазон значений Тета при накоплении данных	2.756~65.272 $^\circ$
Критерий согласия F ²	1.028
Финальные значения R [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0718, wR ₂ = 0.1968
Значения R (все данные)	R ₁ = 0.0802, wR ₂ = 0.2030
Наибольший дифференцированный пик и дыра	0.310, -0.335 $\text{e.}\text{\AA}^{-3}$
Всего отражений / Уникальных отражений	68300 / 12934 [R _(int) = 0.0906]

Пример 3. Получение кристаллической формы А соединения формулы (II)

Способ 1. Соединение формулы (I) (0.2 г) добавляли в этанол (2.4 мл), и полученную смесь нагревали до 50 $^\circ\text{C}$. После растворения медленно добавляли воду (0.48 мл) в реакционный раствор, и смесь перемешивали при 50 $^\circ\text{C}$ в течение 72 часов. После фильтрования отделяли твердый продукт, получая кристаллическую форму А соединения формулы (II).

Способ 2. Соединение формулы (I) (5.0 г) добавляли в этанол (4 объема), и смесь перемешивали до прозрачности. Медленно добавляли в систему воду (1 объем) и затем добавляли затравочные кристаллы (0.5 г) при температуре от 20 до 30 $^\circ\text{C}$. Смесь перемешивали при этой же температуре 15 часов. Затем медленно добавляли воду (3 объема) по каплям, и полученную смесь дополнительно перемешивали 1 - 3 часа. После

фильтрования собирали осадок на фильтре, получая кристаллическую форму А соединения формулы (II).

Пример 4. Исследование кристаллической стабильности кристаллической формы А соединения формулы (II)

Согласно «Guiding Principles for Stability Testing of Raw Materials and Preparations» (Китайская фармакопея, издание 2015 г., часть 4, Общие принципы, Глава 9001), исследовали кристаллическую стабильность кристаллической формы А соединения формулы (II) в условиях высокой температуры (60°C , негерметично), высокой влажности (комнатная температура/относительная влажность 92.5%, негерметично) и сильного света (5000 лк, негерметично), а также в ходе длительных тестов ($25\pm 2^{\circ}\text{C}/60 \pm 5\%$ отн.влажность) и тестов в условиях ускоренного старения ($40\pm 2^{\circ}\text{C}/75 \pm 5\%$ отн.влажность).

Около 20 мг кристаллической формы А соединения формулы (II) отвешивали и помещали на дно стеклянной виалы. Образец распределяли тонким слоем. Для образцов, тестируемых в условиях высокой температуры и высокой влажности, горло виалы закрывали алюминиевой фольгой и пробивали несколько тонких отверстий в фольге для обеспечения контакта образца с атмосферой. Для образцов, тестируемых в условиях сильного света, горло виалы закрывали алюминиевой фольгой и пробивали несколько тонких отверстий в фольге. Образцы, находившиеся в разных условиях, отбирали и анализировали методом XRPD в день 5 и день 10, соответственно. Результаты анализа сравнивали с результатами исходного анализа в день 0. Результаты анализа показаны ниже в таблице 3.

Кристаллическую форму А соединения формулы (II) помещали в медицинские двуслойные мешки из полиэтилена низкой плотности. Каждый медицинский двуслойный мешок из полиэтилена низкой плотности плотно закрывали и затем помещали в однослойный мешок из алюминиевой фольги. Этот однослойный мешок из алюминиевой фольги подвергали высокотемпературной запайке. Эти образцы хранили в пластиковых ведрах в камере с постоянной температурой и влажностью. Упаковка, использовавшаяся в тестах стабильности, имитировала реальную упаковку для хранения. Вещество делили на упаковки по 1.5 г в качестве образцов для теста стабильности под красным светом. Каждый образец упаковывали одинаково и маркировали этикеткой теста стабильности. Образцы, находившиеся в разных условиях, отбирали и анализировали методом XRPD через 3 и 6 месяцев. Результаты анализа сравнивали с результатами исходного анализа в день 0. Результаты анализа показаны ниже в таблице 3.

Таблица 3. Результаты теста стабильности в твердом виде для кристаллической формы А соединения формулы (II)

Условия тестирования	Время	Кристаллическая форма
-	0 дней	Кристаллическая форма А
Высокая температура (60°C, негерметично)	5 дней	Кристаллическая форма А
	10 дней	Кристаллическая форма А
Высокая влажность (25°C/ отн.влажность 92.5%, негерметично)	5 дней	Кристаллическая форма А
	10 дней	Кристаллическая форма А
Контроль для эксперимента со светом ^{*1}	5 дней	Кристаллическая форма А
	10 дней	Кристаллическая форма А
25±2°C/60 ±5% отн.влажность	3 месяца	Кристаллическая форма А
	6 месяцев	Кристаллическая форма А
40±2°C/75 ±5% отн.влажность	3 месяца	Кристаллическая форма А
	6 месяцев	Кристаллическая форма А

Контроль для эксперимента со светом^{*1}: Контрольный образец для эксперимента со светом необходимо приготовить в то же время. Контрольный образец для эксперимента со светом закрывали резбовой крышкой и затем полностью оборачивали алюминиевой фольгой.

Заключение: Кристаллическая форма А соединения формулы (II) имеет хорошую стабильность в условиях высокой температуры, высокой влажности, сильного света, а также длительных экспериментов и экспериментов ускоренного старения.

Биологические тесты

Тест пример 1. Исследование ингибирующего действия соединения на пролиферацию KRAS^{G12C}-мутантных клеток MIA-PA-CA-2

1.1 Цель исследования

Для соединения определяли IC₅₀ ингибирования пролиферации KRAS^{G12C}-мутантных клеток MIA-PA-CA-2.

1.2 Реагент

Основной реагент в данном исследовании включал CellTiter-Glo (Promega, Cat. No. G7573).

1.3 Прибор

Основным прибором, использовавшимся в данном исследовании, был многофункциональный планшет-ридер PerkinElmer EnVision.

1.4 Методика тестирования

1) Адгезивные клетки обрабатывали трипсином, получая суспензию клеток, и проводили подсчет клеток в суспензии для последующего применения.

2) Нужное количество клеток помещали в центрифужную пробирку и добавляли культуральную среду до нужного объема; затем клетки выращивали в 96-луночном планшете с финальной плотностью 2000 клеток на лунку, 100 мкл культуральной среды.

3) После инкубирования в течение 24 часов, готовили 10 мМ раствор соединения в ДМСО и проводили 3-кратные серийные разбавления средой DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко), получая 9 концентраций; добавляли 10 мкл в каждую лунку в двух повторениях. Добавляли 10 мкл DPBS в контрольные лунки (Кон).

4) В тот же день добавляли 50 мкл CellTiter Glo в другой планшет без добавления соединений, и считывали показатели флуоресценции на приборе EnVision. Полученное значение принимали за значение День0.

5) После 72 часов инкубирования клеток с добавлением соединений, среду удаляли и добавляли в лунки по 50 мкл CellTiter Glo. Считывали показатели флуоресценции на приборе EnVision.

6) Анализ полученных данных: Коэффициент ингибирования клеток в каждой лунке вычисляли по следующему уравнению:

$$\text{Коэффициент ингибирования \%} = \left(1 - \frac{F_{\text{Соед.}}}{F_{\text{Кон.}} - F_{\text{День0}}} \right) \cdot 100\%$$

* F_{День0} это значение в изначальном тесте численности клеток для лунки без добавления соединения;

F_{Кон} это интенсивность флуоресценции в контрольной (Кон) группе после 72 часов инкубирования.

F_{Соед} это интенсивность флуоресценции в лунке с соединением после 72 часов инкубирования.

7) Log(агонист) vs. ответ – Вычисленные для каждого соединения коэффициенты ингибирования (коэффициент ингибирования, %) обрабатывали методом нелинейного анализа кривой с переменным коэффициентом наклона, получая значения IC₅₀ для каждого соединения с помощью программы GraphPad Prism по следующему уравнению:

$Y = \text{Нижний} + (\text{Верхний} - \text{Нижний}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \cdot \text{Угловой коэффициент Хилла}))}$

1.5 Результаты анализа

Таблица 4. Результаты соединения по настоящему изобретению в тесте ингибирования пролиферации KRAS^{G12C}-мутантных клеток MIA-PA-CA-2

Тестируемый образец	IC ₅₀ (нМ)
Соединение формулы (I)	0.44

Результаты тестирования показывают, что соединение формулы (I) обладает хорошей ингибирующей активностью в отношении пролиферации клеток в KRAS^{G12C}-мутантной линии клеток MIA-PA-CA-2.

Тест пример 2. Исследование ингибирующего действия соединения на пролиферацию KRAS^{G12C} мутантных клеток H358

2.1 Цель исследования

Соединение исследовали для определения IC_{50} в ингибировании пролиферации KRAS^{G12C}-мутантных клеток H358.

2.2 Реагент

Основные реагенты в данном исследовании включали среду RPMI-1640, антибиотики пенициллин/стрептомицин от Vicente, фетальную телячью сыворотку от Biosera, CellTiter-Glo (детектирующий реагент для люминисцентного анализа жизнеспособности клеток) от Promega, и линию клеток NCI-H358 от Банка клеток Китайской Академии Наук (Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences).

2.3 Прибор

Основным прибором, использовавшимся в данном исследовании, был многоканальный анализатор Nivo (PerkinElmer).

2.4 Методика тестирования:

1) Клетки NCI-H358 инокулировали в белом 96-луночном планшете, и каждая лунка содержала 80 мкл суспензии клеток и 4000 клеток NCI-H358. Планшет с клетками инкубировали в инкубаторе с атмосферой, содержащей углекислый газ, в течение ночи.

2) Тестируемое соединение подвергали серийным 5-кратным разведениям с помощью многоканальной пипетки, получая девять концентраций, от 2 мМ до 5.12 нМ. Тест проводили в двух повторностях. 78 мкл среды добавляли в промежуточный планшет, и затем добавляли в каждую лунку промежуточного планшета 2 мкл серийных разведений соединения в соответствующем положении. После тщательного перемешивания переносили по 20 мкл/лунку в планшет с клетками. Концентрации соединения, перенесенные в планшет с клетками, составляли от 10 мкМ до 0.0256 нМ. Планшет с клетками инкубировали 5 дней в инкубаторе с атмосферой, содержащей углекислый газ. Готовили второй планшет с клетками, и регистрировали сигнал с этого планшета в день добавления соединений как максимальное значение (значение Макс в приведенном ниже уравнении) для последующей обработки результатов. Добавляли в каждую лунку планшета с клетками 25 мкл детектирующего реагента для люминисцентного анализа жизнеспособности клеток, и планшет инкубировали при комнатной температуре 10 минут для стабилизации интенсивности люминисценции. Для считывания планшета применяли многоканальный анализатор.

3) Добавляли в каждую лунку планшета с клетками 25 мкл детектирующего реагента для люминисцентного анализа жизнеспособности клеток, и планшет инкубировали при комнатной температуре 10 минут для стабилизации интенсивности люминисценции. Для считывания планшета применяли многоканальный анализатор.

Анализ результатов

Использовали формулу $(\text{Образец} - \text{Мин}) / (\text{Макс} - \text{Мин}) * 100\%$ для пересчета полученных данных в значение коэффициента ингибирования, и значение IC_{50} можно получить построением кривой по четырем параметрам (режим «log(ингибитор) vs. ответ -- Переменный коэффициент наклона» в GraphPad Prism). Активность соединений по настоящему изобретению в ингибировании пролиферации клеток NCI-H358 показана в таблице 5.

Таблица 5. Результаты соединения по настоящему изобретению в тесте ингибирования пролиферации KRAS^{G12C}-мутантных клеток H358

Тестируемый образец	NCI-H358 IC_{50} (нМ)
Соединение формулы (I)	0.6

Вывод: Соединение формулы (I) демонстрирует хорошую ингибирующую активность в отношении пролиферации клеток NCI-H358.

Тест пример 3. Метаболическая стабильность в гепатоцитах

Цель исследования: Определяли метаболическую стабильность тестируемых соединений в гепатоцитах мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак человека, соответственно.

Методика тестирования: Готовили несколько 96-луночных планшетов для осаждения образцов и присваивали им названия T0, T15, T30, T60, T90, T120, T0-МС, T120-МС и бланковый субстрат, соответственно. Среду для восстановления и среду для инкубирования отбирали заранее и помещали в водяную баню 37°C для подогрева. Криосохраненные гепатоциты извлекали из жидкого азота и немедленно погружали в водяную баню 37°C (примерно на 90 секунд). После того как криосохраненные гепатоциты оттаяли и разошлись, их выливали в центрифужную пробирку, содержащую 40 мл среды для восстановления, и пробирку осторожно переворачивали для ресуспендирования клеток в среде для восстановления. Затем клетки центрифугировали 5 минут при $100 \times g$ при комнатной температуре, и надосадочный раствор удаляли. Гепатоциты ресуспендировали в нужном объеме среды для инкубирования, и жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания трипановым синим. Добавляли 198 мкл суспензии гепатоцитов (0.51×10^6 клеток/мл) в подогретый планшет для инкубирования. В случае контрольной группы на среде для инкубирования добавляли 198 мкл не содержащей гепатоцитов среды для инкубирования в планшеты T0-МС и T120-МС. Все планшеты пре-инкубировали 10 минут в инкубаторе 37°C. Затем добавляли 2 мкл рабочих растворов тестируемого образца и контрольного соединения, соответственно, и смесь хорошо перемешивали. Планшет для инкубирования немедленно помещали в шейкер в инкубаторе и инициировали реакцию, запуская таймер. Для каждого

контрольного момента времени для каждого соединения готовили 2 образца. Условия инкубирования: 37°C, насыщенная влажность и 5% CO₂. В тестовой системе финальная концентрация тестируемого образца составляла 1 мкМ, финальная концентрация контрольного образца составляла 3 мкМ, финальная концентрация гепатоцитов составляла 0.5×10⁶ клеток/мл, и финальная концентрация суммарного органического растворителя составляла 0.96%, из которых финальная концентрация ДМСО составляла 0.1%. По окончании инкубирования до нужной контрольной точки времени, планшет вынимали и добавляли 25 мкл смеси соединения и контрольного соединения с клетками в планшет, содержащий 125 мкл останавливающего раствора (200 нг/мл толбутамида и лабеталола в ацетонитриле). В случае планшета с бланковыми образцами, добавляли 25 мкл не содержащей гепатоцитов среды для инкубирования. Все планшеты герметично закрывали и встряхивали на шейкере при 600 об/мин в течение 10 минут, затем центрифугировали при 3220 × g в течение 20 минут. Надосадочные растворы из тестируемого образца и контрольного образца разводили ультрачистой водой в соотношении 1:3. Все образцы хорошо перемешивали и анализировали методом LC/MS/MS.

Результаты исследования: Полученные результаты показаны в таблице 6.

Таблица 6. Метаболическая стабильность тестируемого соединения в гепатоцитах мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак и человека

Тестируемый образец	Тест-объект	T _{1/2} (мин)	CL _{инт(геп)}	CL _{инт(печень)}
			(мкл/мин/10 ⁶)	(мкл/мин/кг)
Соединение формулы (I)	Мышь CD-1	9.5	146.3	1738.1
	Крыса SD	20.6	67.4	315.2
	Яванский макак	27.0	51.3	184.7
	Бигль	182.2	7.6	52.3
	Человек	99.5	13.9	38.7

Вывод: Исследование метаболической стабильности в гепатоцитах различных видов показало, что соединение формулы (I) обладает хорошей метаболической стабильностью.

Тест пример 4. Тест стабильности *in vitro* в микросомах печени

Цель исследования: Определяли метаболическую стабильность тестируемых соединений в микросомах печени мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак и человека, соответственно.

Методика тестирования: Готовили два 96-луночных планшета для инкубирования и присваивали им названия T60 и NCF60, соответственно. Добавляли 445 мкл рабочих растворов микросом (концентрация микросомального белка печени 0.56 мг/мл) в планшет T60 и NCF60, соответственно, и после этого планшеты пре-инкубировали примерно 10 минут на водяной бане 37°C.

После пре-инкубирования добавляли 5 мкл рабочих растворов тестируемого соединения или контрольного соединения в планшет Т60 и планшет NCF60, соответственно, и смесь хорошо перемешивали. Добавляли 50 мкл калийфосфатного буфера в каждую лунку планшета NCF60 для инициирования реакции. 180 мкл останавливающего раствора (200 нг/мл толбутамида и 200 нг/мл лабеталола в ацетонитриле) и 6 мкл рабочего раствора системы регенерации НАДФ добавляли в останавливающий планшет Т0, и 54 мкл образца переносили из планшета Т60 в останавливающий планшет Т0 (генерировали Т0 образец). Реакцию инициировали добавлением 44 мкл рабочего раствора системы регенерации НАДФ в каждую лунку планшета Т60. Только 54 мкл рабочего раствора микросом, 6 мкл рабочего раствора системы регенерации НАДФ и 180 мкл останавливающего раствора добавляли в планшет Бланк. Таким образом, в образцах с тестируемым соединением или контрольным соединением финальная концентрация соединения, тестостерона, диклофенака и пропафенона составляла 1 мкМ, концентрация микросом печени составляла 0.5 мг/мл, и финальная концентрация ДМСО и ацетонитрила в реакционной системе составляла 0.01% (об/об) и 0.99% (об/об), соответственно. После соответствующего времени (например, 5, 15, 30, 45 и 60 минут) инкубирования, добавляли 180 мкл останавливающих растворов (200 нг/мл толбутамида и 200 нг/мл лабеталола в ацетонитриле) в лунки каждого останавливающего планшета, соответственно. 60 мкл образца удаляли из планшета Т60 для остановки реакции. Все планшеты с образцами хорошо встряхивали и затем центрифугировали при $3220 \times g$ в течение 20 минут. Затем 80 мкл надосадочного раствора отбирали из каждой лунки и разводили в 240 мкл чистой воды для проведения анализа методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Все образцы анализировали методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией.

Результаты исследования: Полученные результаты показаны в таблице 7.

Таблица 7. Метаболическая стабильность протестированного соединения в микросомах печени мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак и человека

Соединение	Тест-объект	T _{1/2} (мин)	CL _{инт(геп)}	CL _{инт(печень)}
			(мкл/мин/10 ⁶)	(мл/мин/кг)
Соединение формулы (I)	Мышь CD-1	4.9	284.6	1126.8
	Крыса SD	23.0	60.2	108.3
	Яванский макак	6.2	224.6	303.2
	Бигль	>145	<9.6	<13.8
	Человек	20.4	67.9	61.1

Вывод: Исследование метаболической стабильности в микросомах печени показало, что соединение формулы (I) обладает хорошей метаболической стабильностью.

Тест пример 5. Тест стабильности в плазме крови

Цель исследования: Определяли стабильность тестируемого соединения в плазме крови мышей CD-1 и человека, соответственно.

Методика тестирования: Криосохраненную плазму оттаивали 10 - 20 минут. После полного оттаивания плазму помещали в центрифугу и центрифугировали при $3220 \times g$ в течение 5 минут для удаления из плазмы несuspendированных частиц и осадка. Готовили 96-луночные планшеты для инкубирования и давали им названия T0, T10, T30, T60, T120, соответственно. 98 мкл бланковых образцов плазмы мышей, крыс, собак, обезьян и людей добавляли в соответствующие планшеты, затем добавляли 2 мкл рабочих растворов тестируемого соединения или контрольного соединения в соответствующие планшеты в двух повторностях. Все образцы инкубировали на водяной бане $37^{\circ}C$. Финальные концентрации тестируемого соединения и контрольного соединения бисакодила, еналаприла малеата, прокаина и пробантина составляли 2 мкМ, а финальное содержание органической фазы составляло 2.0%. По окончании инкубирования до каждой контрольной точки времени извлекали соответствующий планшет и добавляли 400 мкл раствора 200 нг/мл толбутамида и лабеталола в ацетонитриле в каждую соответствующую лунку с образцом для осаждения белка. Все планшеты с образцами герметично закрывали и хорошо встряхивали, затем центрифугировали при $3220 \times g$ в течение 20 минут. Отбирали 50 мкл надосадочного раствора и разводили в 100 мкл ультрачистой воды. Все образцы хорошо перемешивали и затем анализировали методом LC/MS/MS.

Результаты исследования: Полученные результаты показаны в таблице 8.

Таблица 8. Стабильность протестированного соединения в плазме крови мышей CD-1 и человека

Соединение	Тест-объект	Детектирование содержания тестируемого соединения через 120 минут
Соединение формулы (I)	Мышь CD-1	94%
	Человек	93%

Вывод: Соединение формулы (I) имеет хорошую стабильность в плазме крови человека и мыши.

Тест пример 6: Тест стабильности в цельной крови

Цель исследования: Определяли стабильность тестируемого соединения в цельной крови мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль и яванских макак, соответственно.

Методика тестирования: В день проведения исследования или в день перед проведением исследования собирали свежие порции цельной крови мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль и яванских макак, используя антикоагулянт ЭДТА-К2. Перед началом исследования цельную кровь смешивали с PBS в соотношении 1:1 (об/об), и

смесь подогрели на водяной бане 37°C в течение 10 - 20 минут. Готовили 96-луночные планшеты для инкубирования и давали им названия T0, T30, T60, T240, соответственно. В соответствующих планшетах, включая планшеты T0, T30, T60 и T240, смешивали 2 мкл рабочих растворов тестируемого соединения или контрольного соединения с 98 мкл бланковой цельной крови мышей, крыс, собак, обезьян и человека, в двух повторностях. Все образцы инкубировали в водяной бане 37°C. Финальная концентрация тестируемого соединения составляла 5 мкМ, а финальная концентрация контрольного соединения составляла 2 мкМ. По окончании инкубирования до каждой контрольной точки времени извлекали соответствующий планшет и немедленно добавляли 100 мкл ультрачистой воды в соответствующие лунки с образцами, хорошо перемешивали, затем добавляли 800 мкл раствора 200 нг/мл толбутамида и лабеталола в ацетонитриле для осаждения белка. Планшеты с образцами герметично закрывали и хорошо встряхивали, затем центрифугировали при 3220 x g в течение 20 минут. Отбирали 150 мкл надосадочного раствора и анализировали методом LC/MS/MS.

Результаты исследования: Полученные результаты показаны в таблице 9.

Таблица 9. Стабильность протестированного соединения в цельной крови мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль и яванских макак

Соединение	Тест-объект	Детектирование содержания тестируемого соединения через 240 минут
Соединение формулы (I)	Мышь CD-1	117%
	Крыса SD	115%
	Яванский макак	77%
	Бигль	102%

Вывод: Исследование стабильности в цельной крови различных видов животных показали, что соединение формулы (I) имеет хорошую стабильность в цельной крови.

Тест пример 7: Исследование степени связывания с белком

Цель исследования: Определяли степень связывания тестируемого соединения с белком в плазме крови мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак и человека методом равновесного диализа.

Методика тестирования: Готовили образцы плазмы крови с концентрацией соединения 2 мкМ, используя плазму перечисленных выше пяти видов животных, помещали в 96-луночный прибор для проведения равновесного диализа, и проводили диализ в фосфатном буферном растворе при 37±1°C в течение 4 часов. Варфарин использовали как контрольное соединение в данном исследовании. Концентрацию тестируемого соединения в плазме крови и диализном буфере определяли методом LC-MS/MS.

Результаты исследования: Полученные результаты показаны в таблице 10.

Таблица 10. Степень связывания тестируемого соединения с белком в плазме крови мышей CD-1, крыс SD, собак породы бигль, яванских макак и человека

Соединение	Тест-объект	Процент несвязанного с белком (%)
Соединение формулы (I)	Мышь CD-1	1.5
	Крыса SD	4.8
	Яванский макак	7.8
	Бигль	3.3
	Человек	4.8

Вывод: Исследование степени связывания с белком в плазме крови показало, что соединение формулы (I) имеет высокий процент соединения, находящегося в плазме в несвязанном с белком состоянии.

Тест пример 8. Исследование фармакокинетики *in vivo*

1) Исследование фармакокинетики тестируемого соединения при пероральном введении и внутривенной инъекции на крысах SD

Тестируемое соединение смешивали со смесью 5% диметилсульфоксид/95% (10% гидроксипропил- β -циклодекстрин) раствор. Полученную смесь интенсивно перемешивали и обрабатывали ультразвуком, получая 1 мг/мл прозрачный раствор, который фильтровали через микропористую мембрану для дальнейшего применения. Отбирали самцов крыс линии SD возрастом 7 – 10 недель и вводили растворы тестируемых соединений внутривенно или перорально. В течение определенного периода времени собирали цельную кровь и обрабатывали, получая плазму крови. Концентрацию лекарственного средства определяли методом LC-MS/MS, и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA). Результаты исследования приведены в таблице 11:

Таблица 11. Фармакокинетические параметры протестированного соединения

Путь введения	Фармакокинетические параметры	Соединение формулы (I)
	Процент вещества, несвязанного с белком (% несвязанного)	4.8
Внутривенная инъекция	Доза (мг/кг)	2.0
	Время полужизни, $T_{1/2}$ (ч)	1.9
	Скорость выведения, CL (мл/мин/кг)	71.5
	Кажущийся объем распределения, $Vd_{ss}/Vd_{ss,u}$ (л/кг)	10.6/221
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-посл}/AUC_u$ (нМ·ч)	653/31.3
Пероральное введение	Доза (мг/кг)	9.8
	Время удерживания, $T_{макс}$ (ч)	1.5
	Пиковая концентрация, $C_{макс}/C_{макс,u}$ (нМ)	220/10.6
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-посл}/AUC_u$ (нМ·час)	995/47.8
	Степень биодоступности F (%)	30.5%

Примечание: $V_{d_{ss,u}}$ это кажущийся объем распределения для несвязанного с белками крови ($V_{d_{ss,u}} = V_{d_{ss}} / PPB(\text{несвязанный}\%)$); $C_{\text{макс, u}}$ и $AUC_{0-\text{посл, u}}$ представляют собой соответствующие значения для несвязанного с белками крови ($C_{\text{макс, u}} = C_{\text{макс}} \times PPB(\text{несвязанный}\%)$; $AUC_{0-\text{посл, u}} = AUC_{0-\text{посл}} \times PPB(\text{несвязанный}\%)$)

Вывод: исследование фармакокинетики показало, что соединение формулы (I) имеет высокое содержание несвязанного вещества в плазме крови и высокую пероральную биодоступность в тестах на крысах.

2) Исследование фармакокинетики кристаллической формы А соединения формулы (II) при пероральном введении крысам SD

109.72 мг тестируемого соединения аккуратно отвешивали и помещали в стеклянную пробирку. Добавляли 774 мкл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400), и полученную смесь перемешивали 5 минут. Добавляли 10 мл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400), и полученную смесь перемешивали 5 минут, получая однородную опалесцирующую суспензию. Отбирали самцов крыс SD возрастом 7 - 10 недель и перорально вводили им раствор соединения-кандидата. Отбирали образцы цельной крови в определенные точки времени и готовили из них препараты плазмы. Анализировали содержание лекарственного соединения методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA). Результаты исследования показаны в таблице 12:

Таблица 12. Результаты исследования фармакокинетики тестируемого соединения

Путь введения	Фармакокинетические параметры	Кристаллическая форма А соединения формулы (II)
Пероральное введение	Доза (мг/кг)	92.3
	Время удерживания, $T_{\text{макс}}$ (ч)	5.33
	Пиковая концентрация, $C_{\text{макс}}$	1397
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-\text{посл}}$	11532

Вывод: Исследование фармакокинетики показало, что кристаллическая форма А соединения формы (II) демонстрирует высокое содержание вещества в плазме крови у крыс.

3) Исследование фармакокинетики тестируемого соединения при пероральном введении и внутривенной инъекции мышам CD

Тестируемое соединение смешивали со смесью 5% диметилсульфоксид/95% (10% гидроксипропил- β -циклодекстрин) раствор. Полученную смесь перемешивали на вихревой мешалке и обрабатывали ультразвуком, получая 1 мг/мл прозрачный раствор, который фильтровали через микропористую мембрану для дальнейшего использования. Отбирали самцов мышей CD возрастом 7-10 недель и вводили растворы тестируемого

соединения внутривенно или перорально. В течение определенного периода времени собирали цельную кровь и обрабатывали для получения плазмы. Определяли концентрацию лекарственного соединения методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA). Результаты анализа показаны в таблице 13:

Таблица 13. Фармакокинетические параметры протестированного соединения

Путь введения	Фармакокинетические параметры	Соединение формулы (I)
	Процент вещества, несвязанного с белком (% несвязанного)	12.0
Внутривенная инъекция	Доза (мг/кг)	2.0
	Время полужизни, $T_{1/2}$ (ч)	1.7
	Скорость выведения, CL (мл/мин/кг)	40.6
	Кажущийся объем распределения, $V_{d_{ss}}/V_{d_{ss,u}}$ (л/кг)	3.9/32.3
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-посл}/AUC_u$ (нМ.ч)	1297/155.6
Пероральное введение	Доза (мг/кг)	10.3
	Время удерживания, $T_{макс}$ (ч)	1.0
	Пиковая концентрация, $C_{макс}/C_{макс,u}$ (нМ)	431/51.7
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-посл}/AUC_u$ (нМ.час)	1422/170.6
	Степень биодоступности F (%)	21.9%

Примечание: $V_{d_{ss,u}}$ это кажущийся объем распределения для несвязанного с белками крови ($V_{d_{ss,u}}=V_{d_{ss}}/PPB(\text{несвязанный}\%)$); $C_{макс,u}$ и $AUC_{0-посл,u}$ представляют собой соответствующие значения для несвязанного с белками крови ($C_{макс,u}=C_{макс} \times PPB(\text{несвязанный}\%)$; $AUC_{0-посл,u}=AUC_{0-посл} \times PPB(\text{несвязанный}\%)$)

Вывод: исследование фармакокинетики показало, что соединение формулы (I) имеет высокое содержание несвязанного вещества в плазме крови и высокую пероральную биодоступность в тестах на мышах.

4) Исследование фармакокинетики тестируемого соединения при пероральном введении собакам породы бигль

Аккуратно отвешивали 680.397 мг тестируемого соединения и добавляли 50 мл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400). Полученную смесь перемешивали 10 минут и обрабатывали ультразвуком 10 минут. Добавляли 50 мл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400) и гомогенизировали смесь 10 минут с помощью гомогенизатора. Добавляли 11 мл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400). Полученную смесь обрабатывали ультразвуком 5 минут и перемешивали 10 минут. Добавляли 358 мкл 0.5%-ного водного раствора метилцеллюлозы (вязкость 400) и перемешивали 2 минуты. Отбирали самцов собак породы бигль возрастом больше шести месяцев и вводили им перорально раствор соединения-кандидата. Отбирали образцы цельной крови в определенные точки времени и

готовили из них препараты плазмы. Анализировали содержание лекарственного соединения методом LC-MS/MS и вычисляли фармакокинетические параметры с помощью программы Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA). Результаты исследования показаны в таблице 14:

Таблица 14. Фармакокинетические параметры протестированного соединения

Путь введения	Фармакокинетические параметры	Кристаллическая форма А соединения формулы (II)
Пероральное введение	Доза (мг/кг)	24.5
	Время удерживания, $T_{\text{макс}}$ (ч)	2.50
	Пиковая концентрация, $C_{\text{макс}}$	2435
	Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени $AUC_{0-\text{посл}}$	16700

Вывод: Исследование фармакокинетики показало, что кристаллическая форма А соединения формы (II) демонстрирует высокое содержание вещества в плазме крови у собак.

Тест пример 9. Исследование фармакодинамики *in vivo*

Исследование фармакодинамики *in vivo* в опухолевой модели подкожного трансплантата человеческих клеток рака поджелудочной железы Mia PaCa-2 на бестимусных мышах Balb/c

1. Приготовление культуры клеток и опухолевой ткани

Культура клеток: Человеческие клетки рака поджелудочной железы Mia PaCa-2 (ATCC-CRL-1420) выращивали монослоем *in vitro* в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сыворотки и 2.5% лошадиной сыворотки в инкубаторе 37°C, 5% диоксида углерода. Клетки переседали путем стандартного расщепления смесью трипсин-ЭДТА дважды в неделю. Когда насыщение клеток достигло 80%-90% и число клеток соответствовало нужному, клетки собирали, подсчитывали и ресуспендировали в нужном объеме PBS. Добавляли матригель в соотношении 1:1, получая суспензию клеток с плотностью 25×10^6 клеток/мл.

Инокуляция клеток: 0.2 мл (5×10^6 клеток/мышь) клеток Mia PaCa-2 (плюс матригель, 1:1 по объему) подкожно инокулировали в правый бок каждой мыши. Когда средний объем опухоли достигал 190 мм³, мышей рандомно распределяли на группы по объему опухоли и начинали введение согласно протоколу, описанному в таблице 15.

Таблица 15. Распределение мышей по тестовым группам и протокол введения

Группа	Число животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Объем ввода (мкл/г)	Путь введения	Частота введения
1	6	Носитель	--	10	PO	QD x22
2	6	Соединение формулы (I)	10	10	PO	QD x22
3	6	Соединение формулы (I)	30	10	PO	QD x22

Примечание: PO означает пероральное введение; QD означает введение один раз в сутки.

2. Измерение опухолей и индикаторы анализа

Диаметр опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю. Формула для вычисления объема опухоли: $V = 0.5a \times b^2$, где a и b представляют собой большой и малый диаметры опухоли, соответственно.

Противоопухолевую эффективность соединения оценивали по параметру TGI (%) или относительной скорости пролиферации опухоли T/C (%). Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) = $TRTV / CRTV \times 100\%$ (TRTV: RTV в группе на соединении; CRTV: RTV в группе на отрицательном контроле). Относительный объем опухоли (RTV) вычисляли по результатам измерения опухоли, по формуле $RTV = V_t / V_0$, где V_0 это средний для группы объем опухоли в начале введения соединения (т.е. D0), и V_t это средний для группы объем опухоли в определенный момент измерения. Для TRTV и CRTV использовали данные на один и тот же день.

TGI (%) означает степень ингибирования роста опухоли. $TGI(\%) = [(1 - (\text{средний объем опухоли в конце введения соединения в тестовой группе} - \text{средний объем опухоли в начале введения соединения в тестовой группе})) / (\text{средний объем опухоли в конце теста в контрольной группе} - \text{средний объем опухоли в начале теста в контрольной группе})] \times 100\%$.

3. Результаты исследования

Результаты исследования показаны на фиг. 4 и 5.

Результаты в День 22 после введения соединения показаны в таблице 16.

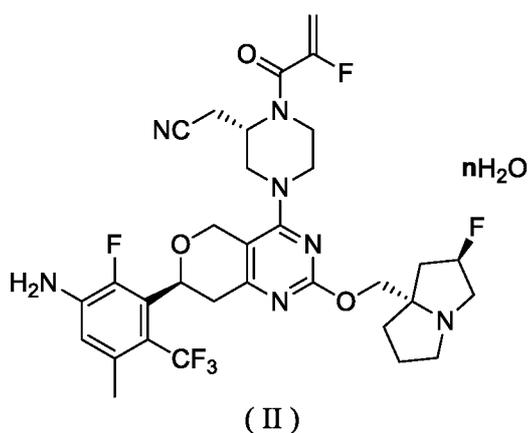
Таблица 16. T/C и TGI в День 22 после начала введения соединения

Соединение	Доза	Средний объем опухоли	T/C	TGI
Носитель	-	2016.29 мм ³	-	-
Соединение формулы (I)	10 мг/кг	249.87 мм ³	12.39%	93.06%
Соединение формулы (I)	30 мг/кг	124.14 мм ³	6.16%	99.64%

Вывод: Соединение формулы (I) оказывает значительное опухоль-ингибирующее действие. Кроме того, вес тела мышей в каждой группе, которой вводили соединения, является стабильным, и не наблюдается явной непереносимости.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (II),

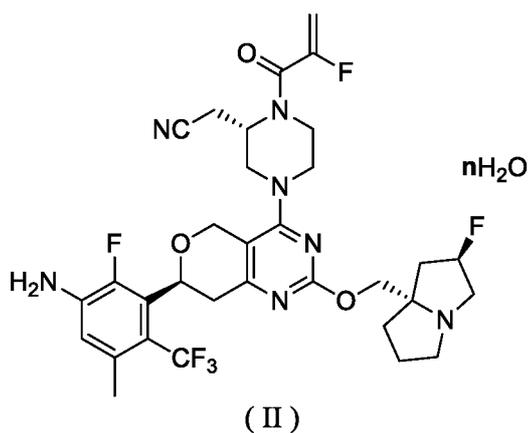


где n выбран из чисел от 0 до 3.

2. Соединение по п. 1, где n выбран из 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 и 3.

3. Соединение по п. 2, где n равен 2.

4. Кристаллическая форма А соединения формулы (II) по любому из пп. 1 - 3,



характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой (XRPD) с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $8.514\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$ и $18.122\pm 0.200^\circ$.

5. Кристаллическая форма А по п. 4, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой (XRPD) с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $6.218\pm 0.200^\circ$, $8.514\pm 0.200^\circ$, $12.299\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$, $16.903\pm 0.200^\circ$, $18.122\pm 0.200^\circ$, $18.927\pm 0.200^\circ$ и $25.580\pm 0.200^\circ$.

6. Кристаллическая форма А по п. 5, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой (XRPD) с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ $6.218\pm 0.200^\circ$, $8.514\pm 0.200^\circ$, $11.663\pm 0.200^\circ$, $12.299\pm 0.200^\circ$, $14.689\pm 0.200^\circ$, $16.903\pm 0.200^\circ$, $18.122\pm 0.200^\circ$, $18.927\pm 0.200^\circ$, $19.364\pm 0.200^\circ$, $20.386\pm 0.200^\circ$, $21.914\pm 0.200^\circ$ и $25.580\pm 0.200^\circ$.

7. Кристаллическая форма А по п. 6, характеризующаяся порошковой

рентгеновской дифрактограммой (XRPD) с характеристичными дифракционными пиками при значениях углов 2θ 6.218°, 8.514°, 11.663°, 12.299°, 14.689°, 16.903°, 18.122°, 18.554°, 18.927°, 19.364°, 20.386°, 21.914°, 22.640°, 23.867°, 24.553°, 24.806°, 25.580°, 25.988°, 27.147°, 27.715°, 29.135° и 31.799°.

8. Кристаллическая форма А по п. 7, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму (XRPD), изображенную на фиг. 1.

9. Кристаллическая форма А по любому из пп. 4 - 8, имеющая диаграмму дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с эндотермическим пиком при $115.37^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.

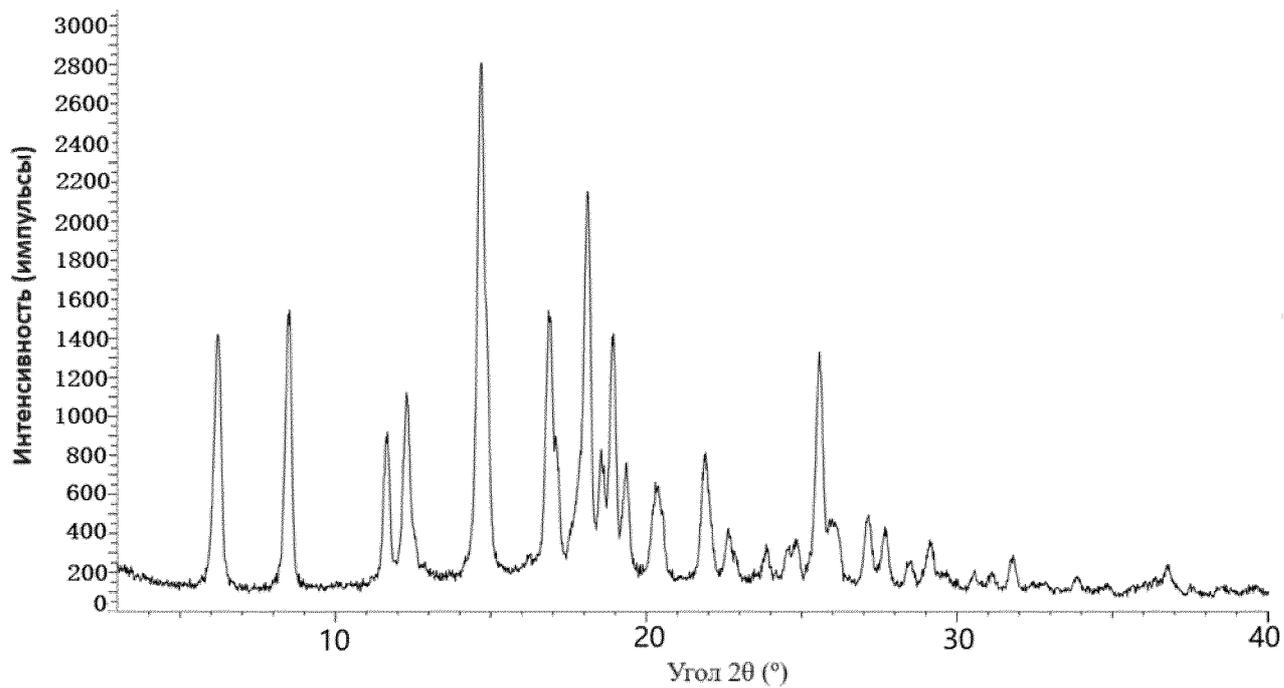
10. Кристаллическая форма А по п. 9, имеющая диаграмму дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), изображенную на фиг. 2.

11. Кристаллическая форма А по любому из пп. 4 - 8, имеющая диаграмму термогравиметрического анализа (ТГА) с потерей веса до 5.379% при $150.0^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.

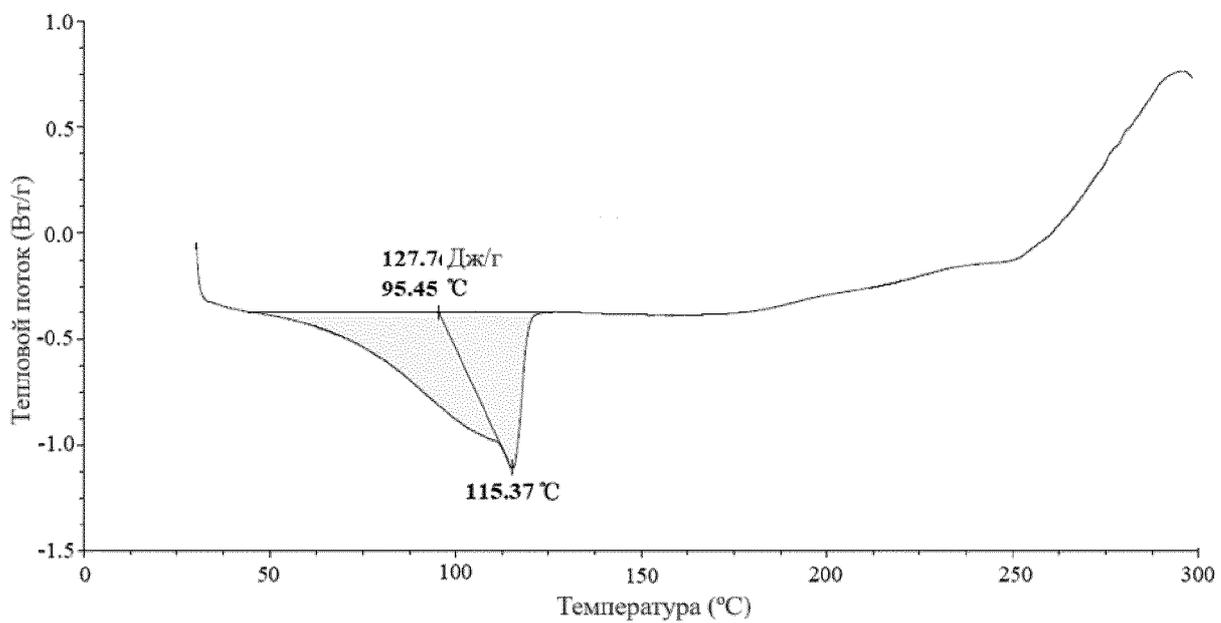
12. Кристаллическая форма А по п. 11, имеющая диаграмму термогравиметрического анализа (ТГА), изображенную на фиг. 3.

13. Применение соединения по любому из пп. 1 - 3 или кристаллической формы А по любому из пп. 4 - 12 в производстве лекарственного средства для лечения солидных опухолей.

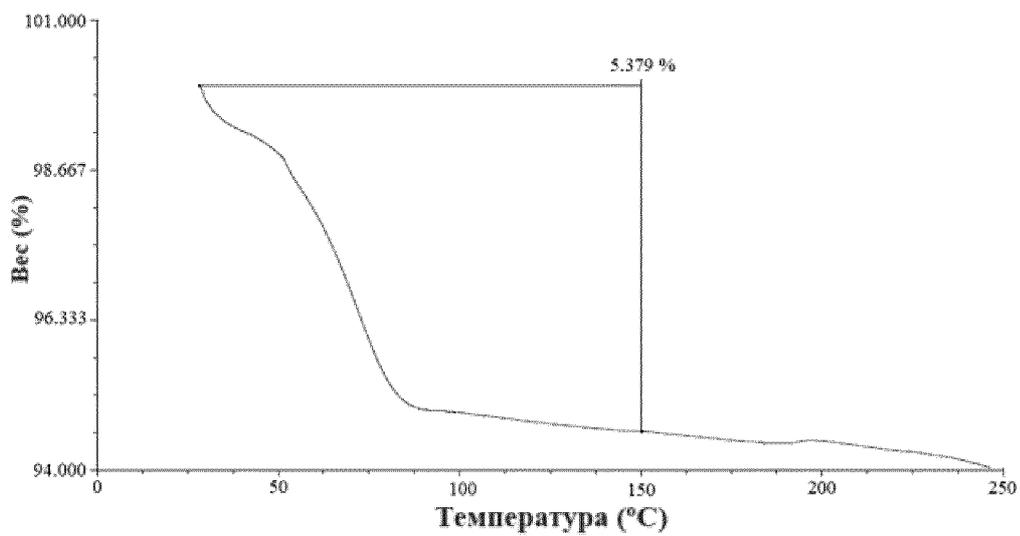
14. Применение по п. 13, где солидные опухоли представляют собой рак легкого или рак прямой кишки.



Фиг. 1



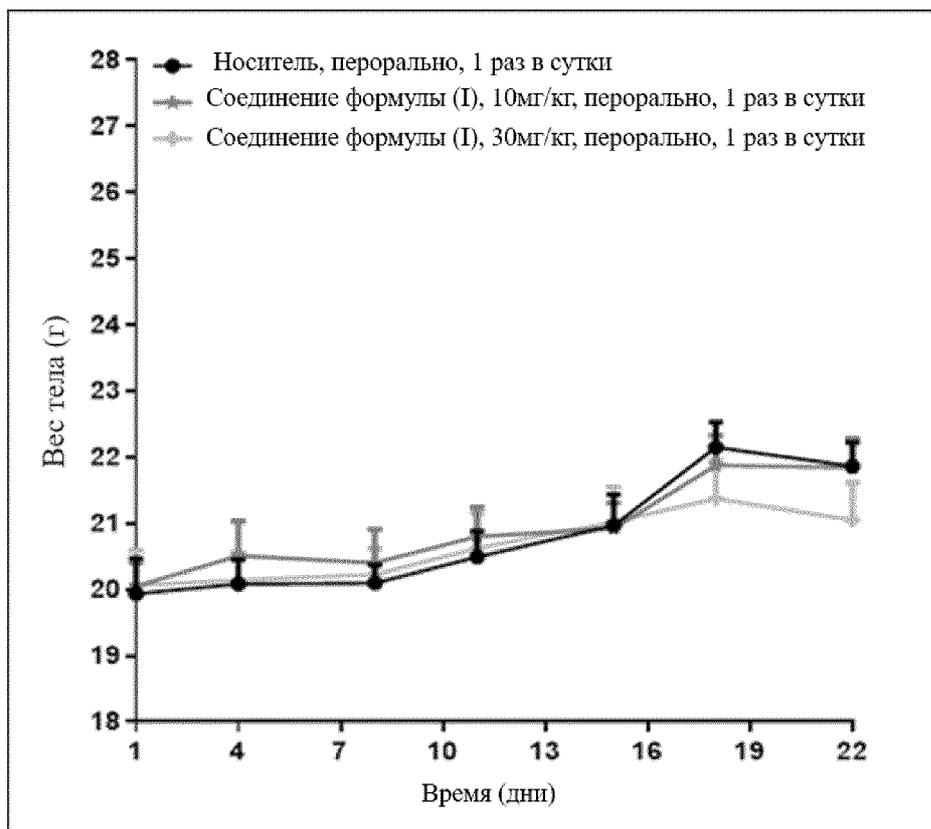
Фиг. 2



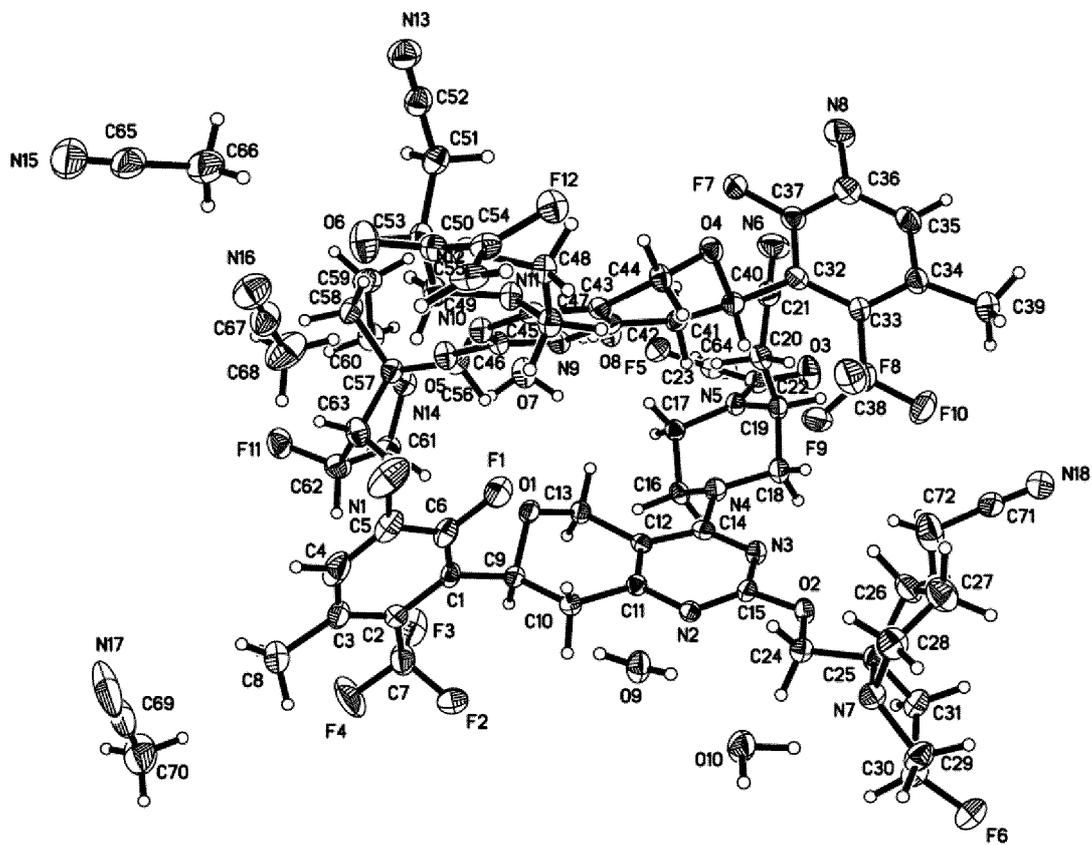
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6