

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491430 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.26

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.02

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)  
C07D 471/04 (2006.01)  
C07D 487/00 (2006.01)  
C07D 491/04 (2006.01)  
C07D 495/04 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01)  
A61K 31/437 (2006.01)

(54) ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗ GCN2 И PERK

(31) 63/285,833; 63/348,557

(32) 2021.12.03; 2022.06.03

(33) US

(86) PCT/US2022/051717

(87) WO 2023/102228 2023.06.08

(71) Заявитель:

ДЕСИФЕРА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ЭлЭлСи (US)

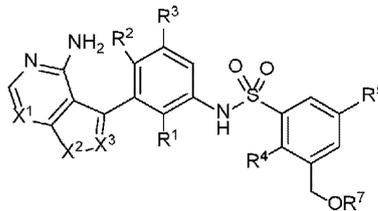
(72) Изобретатель:

Ахн Ю Ми, Аль-Ани Гада, Флинн  
Дэниел Л., Джавед Салим, Керни  
Патрик, Ле Бурдоннек Бертран,  
Штольц Кристен, Цвикер Джеффри  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены соединения формулы 1-А, которые представляют собой ингибиторы киназы GCN2 или киназы PERK, и способы лечения заболеваний, включая заболевания, ассоциированные с киназой GCN2 или киназой PERK, с помощью указанных соединений.



A1

202491430

202491430

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581323EA/019

### ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗ GCN2 И PERK

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/285833, поданной 3 декабря 2021 г., и по предварительной заявке на патент США № 63/348557, поданной 3 июня 2022 г., содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Раковые клетки нуждаются в постоянном источнике питательных веществ для поддержания их аномального роста и быстрого деления. Как часть таких питательных веществ, аминокислоты необходимы для поддержания высоких метаболических потребностей опухолевых клеток.

[0003] GCN2 представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, одну из киназ эукариотического фактора инициации  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), которые являются главными регуляторами интегрированной реакции на стресс (ISR). ISR необходима для поддержания клеточного гомеостаза в условиях широкого диапазона факторов, вызывающих стресс, и активируется, когда клетки адаптируются к стрессовым условиям, таким как гипоксия и дефицит аминокислот. ISR регулируется посредством фосфорилирования и активации киназ eIF2 $\alpha$ , включая GCN2, которые действуют как ранние респондеры на нарушения клеточного гомеостаза. В дополнение к GCN2 существует три других семейства киназ eIF2 $\alpha$ , включая PKR-подобную киназу ER (PERK), зависимую от двухнитевой РНК протеинкиназу (PKR) и гем-регулируемую киназу eIF2 $\alpha$  (HRI). Все четыре киназы eIF2 $\alpha$  имеют обширную гомологию в своих киназных каталитических доменах, но содержат различные регуляторные домены. Каждая из киназ IF2 $\alpha$  реагирует на различные виды стресса, связанные с окружающей средой, и физиологические виды стресса, которые отражают их уникальные механизмы регуляции. Киназа PERK активируется в условиях стресса, включая истощение АТФ и реакцию несвернутых белков, и, как и GCN2, активация киназы PERK приводит к положительной регуляции ключевого фактора транскрипции ISR ATF4.

[0004] В условиях ограничения незаменимых аминокислот или других факторов, вызывающих стресс (УФ-облучения, окислительно-восстановительного стресса или ингибирования протеасом), GCN2 фосфорилирует eIF2 $\alpha$ , которая ингибирует образование нового тройного комплекса и, следовательно, происходит ингибирование инициации трансляции мРНК. Снижая общую трансляцию мРНК в опухолевых клетках, фосфорилирование eIF2 $\alpha$  также приводит к увеличению трансляции фактора транскрипции ISR ATF4, который увеличивает экспрессию множества генов реакции на стресс, включая гены, предназначенные для доставки аминокислот в опухолевые клетки: т. е. ферментов синтеза аминокислот и транспортеров, опосредующих приток

аминокислот в опухолевые клетки. ATF4 сверхэкспрессируется в солидных опухолях и опухолях жидких тканей человека, что свидетельствует о его важной функции в развитии опухоли.

[0005] Аспарагин представляет собой важную аминокислоту, вовлеченную в несколько биосинтетических путей, которые в значительной степени влияют на канцерогенез и биологию опухоли. Все клетки нуждаются в аспарагине для синтеза собственного белка и роста. Нормальные клетки будут удовлетворять большую часть своих потребностей в аспарагине за счет внутреннего синтеза. По сравнению с нормальными клетками раковые клетки требуют повышенного количества аспарагина для роста и размножения, они не способны самостоятельно продуцировать это необходимое количество и должны полагаться на циркулирующий аспарагин, чтобы выжить. Аспарагинсинтетаза (ASNS) катализирует синтез аспарагина из аспартата и глутамина. L-аспарагиназа (ASNаза) удаляет циркулирующий аспарагин, тем самым лишая раковые клетки ключевого питательного вещества и обуславливая их гибель. Применение L-аспарагиназы, первого примера противоракового лечения, нацеленного на особенности метаболизма опухоли, представляет собой хорошо зарекомендовавший себя способ лечения детского острого лимфобластного лейкоза (ALL), однако токсичность ограничивает его применение за пределами этой популяции пациентов. Чрезвычайно низкий уровень экспрессии ASNS во многих клеточных линиях ALL по сравнению с уровнем нормальных клеток определяет истощение запасов аспарагина в качестве эффективного способа лечения в связи с необычной зависимостью клеток от циркулирующего в сыворотке крови аспарагина в качестве необходимого питания для роста. Слабый ответ на аспарагиназу ассоциирован с повышенным риском рецидива. При других гематологических и солидных видах рака экспрессируются низкие уровни ASNS и, следовательно, они также должны являться ауксотрофными по аспарагину и чувствительными к аспарагиназе. С другой стороны, ASNS сверхэкспрессируется при некоторых типах рака, что способствует клеточной пролиферации, химиорезистентности и метастатическому поведению. В случае видов рака, устойчивых к аспарагиназе, эффект истощения запасов аспарагина в крови посредством L-аспарагиназы, напротив, приводит к значительной сверхэкспрессии ASNS для компенсации, фактически сводя к нулю эффект химиотерапевтического средства. Многочисленные исследования показали, что ASNS находится в центре клеточного ответа на дефицит аминокислот и другие формы клеточного стресса. Посредством регуляции транскрипции ген ASNS представляет собой мишень двух сигнальных путей, направленных на обеспечение выживания клеток. Первый, под названием аминокислотный ответ (AAR), активируется киназой GCN2 в условиях несбалансированной доступности аминокислот. Второй путь, под названием реакция несвернутых белков (UPR), активируется киназой PERK в условиях повышенного стресса эндоплазматического ретикула. Пути AAR и UPR сходятся на фосфорилировании eIF2 $\alpha$ , что вызывает ослабление общего синтеза белка и, в то же время, предпочтительную трансляцию выбранной популяции мРНК, включая

транскрипционный фактор ATF4. ATF4 представляет собой основной фактор индуцирования ASNS, выступающий в качестве транс-активатора посредством связывания с энхансерным элементом в промоторной области ASNS.

[0006] GCN2 сенсibiliзирует раковые клетки с низким базальным уровнем экспрессии ASNS в отношении противолейкозного средства, L-аспарагиназы, *in vitro* и *in vivo*. Лечение ингибиторами GCN2 приводило клетки острого лимфобластного лейкоза в состояние чувствительности по отношению к L-аспарагиназе посредством предотвращения индуцирования ASNS. Ингибиторы GCN2 проявляют синергетическое антипролиферативное действие с L-аспарагиназой при видах рака с низким/недостаточным уровнем ASNS. Следовательно, комбинированное лечение ингибиторами GCN2 и L-аспарагиназой демонстрирует перспективность в достижении улучшенных исходов при остром лимфобластном лейкозе и других типах рака. Клетки острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза и рака поджелудочной железы особенно чувствительны к комбинированному лечению ингибиторами L-аспарагиназы и GCN2. В ранее опубликованных исследованиях была продемонстрирована стойкая противоопухолевая активность комбинированного лечения ингибиторами ASНазы и GCN2 острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза и при наличии панкреатических раковых клеток по сравнению с результатами монотерапии ингибиторами L-аспарагиназы или GCN2. Таким образом, ингибиторы GCN2 могут представлять собой сенсibiliзирующие средства в отношении L-аспарагиназы, применяемой для лечения таких опухолей. Таким образом, ингибирование GCN2 повышает чувствительность к лечению L-аспарагиназой, предотвращая индуцирование ASNS в раковых клетках с низкой экспрессией ASNS на базальных уровнях.

[0007] Ингибирование GCN2 также может представлять собой эффективную стратегию целенаправленного воздействия на микросреду опухоли, включая иммунную систему, включая триптофан-зависимый иммунологический надзор за опухолевыми клетками.

[0008] Микросреда опухоли [TME; ряд внеклеточных компонентов и стромальных клеток (эндотелиальных клеток, ассоциированных с раком фибробластов, ассоциированных с опухолью макрофагов, опухолеинфильтрирующих Т-клеток), которые окружают опухолевые клетки] характеризуется дефицитом кислорода и основных питательных веществ, таких как глюкоза и аминокислоты, что приводит в результате к образованию общей иммуносупрессивной среды.

[0009] Множество видов опухолей развивались таким образом, чтобы избежать иммунологического надзора, извлекая выгоду из своей метаболической гибкости и перенаправляя питательные вещества в свою пользу. Стромальные клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) внутри опухоли создают бедную питательными веществами среду, которая подавляет иммунную функцию и поддерживает рост опухоли.

[00010] Повышенный катаболизм триптофана, одной из незаменимых

аминокислот, контролируемый сверхэкспрессией важнейших ферментов метаболизма триптофана [индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и триптофан-2,3-диоксигеназы (TDO)], контролируется клетками микросреды опухоли, что приводит к образованию иммуносупрессивной среды при многих типах рака. Локальное истощение триптофана считается важным механизмом иммуносупрессии Т-клеток. В Т-клетках киназу GCN2 идентифицировали в качестве молекулярного сенсора депривации триптофана. Активация GCN2 за счет истощения запасов триптофана вызывает апоптоз и снижает пролиферацию Т-клеток. GCN2 является ключевым эффекторным сигнальным компонентом для IDO/TDO и считается метаболической контрольной точкой Т-клеток, которые находятся в сильной зависимости от триптофана.

[00011] Путь GCN2 важен не только для ускользания опухоли от иммунного ответа, но также играет активную роль в модулировании других аспектов микросреды опухоли. Было продемонстрировано, что нокдаун GCN2 предотвращает индуцированную депривацией аминокислот (AAD) экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который используется опухолями для увеличения снабжения питательными веществами за счет усиления васкуляризации. Таким образом, активация пути GCN2/ATF4 способствует росту опухоли и ангиогенезу посредством AAD-опосредованной экспрессии VEGF. Отмена экспрессии ATF4 или GCN2 приводила к значительному подавлению роста опухоли *in vivo*.

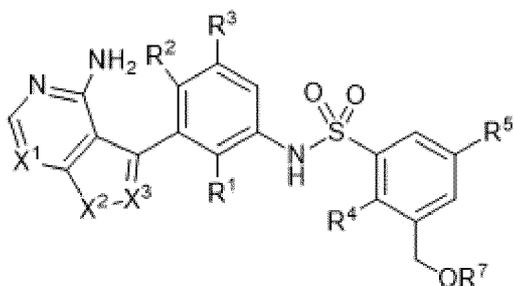
[00012] Следовательно, селективное ингибирование GCN2 может приводить как к повышению активности иммунной системы, так и к снижению васкуляризации в микросреде опухоли. Путь GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4 имеет исключительно большое значение для поддержания метаболического гомеостаза в опухолевых клетках в условиях стресса и для поддержания микросреды иммуносупрессированных иммунных клеток. Путь PERK-ATF4 также имеет исключительно большое значение для поддержания гомеостаза в опухолевых клетках в условиях стресса. Сообщалась, что существует перекрестная регуляция сигнальных путей GCN2 и PERK, таким образом, что ингибирование GCN2 может приводить к активации PERK в качестве компенсаторного механизма, и наоборот, что ингибирование PERK может приводить к активации GCN2 в качестве компенсаторного механизма.

[00013] Существует потребность в ингибиторах GCN2 и/или PERK, которые модулируют проопухолевые аспекты GCN2 и/или PERK, как в опухолевых клетках (автономных опухолевых клетках), так и в микросреде опухолевых иммунных клеток.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[00014] В данном документе описаны соединения, которые модулируют (например, ингибируют или активируют) киназу GCN2 (общий контроль, недерепрессивная 2) и/или киназу PERK (PKR-подобную киназу ER), и способы их применения для лечения нарушений, включая заболевания, ассоциированные с GCN2 или PERK.

[00015] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение, представленное формулой I-A:



Формула I-A,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где: каждый из  $X^1$  и  $X^3$  независимо выбран из группы, состоящей из CH и N;  $X^2$  выбран из группы, состоящей из  $NR^6$ , O, и S; каждый из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано, и алкокси;  $R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;  $R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;  $R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенил, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и  $R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

[00016] В другом варианте осуществления в данном документе описана фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в данном документе (например, соединение формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанное в данном документе), и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[00017] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[00018] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[00019] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[00020] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ активации киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение



эффективного количества одного или более терапевтических средств.

[00028] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанного в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[00029] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения нарушения, выбранного из группы, состоящей из меланомы, фибросаркомы, рака щитовидной железы, рака яичников, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака мочевого пузыря, гастроинтестинальных стромальных опухолей, солидных опухолей, гемоконтактных видов рака, острого миелогенного лейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL) и других видов рака, обусловленных активацией сигнального пути GCN2, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанного в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[00030] На фиг. 1 представлено графическое изображение, демонстрирующее неожиданную стимуляцию маркера UPR/ISR ATF4 (черные столбики) в ответ на возрастающие концентрации соединения 2.

[00031] На фиг. 2 показан график стимуляции образования олигомеров PERK, индуцированного соединением 2, в анализе NanoBRET.

[00032] На фиг. 3 показана стимуляция следующих за PERK сигнальных белков ATF4 и CHOP (актин в качестве контроля нагрузки) в клетках множественной миеломы H929.

[00033] На фиг. 4 представлено графическое изображение, демонстрирующее стимуляцию генов-мишеней ATF4 в ответ на возрастающие концентрации соединения 2 в клетках множественной миеломы H929.

[00034] На фиг. 5 проиллюстрировано влияние соединения 2 в отношении показателей апоптотического пути в клетках множественной миеломы H929.

[00035] На фиг. 6A, 6B, 6C и 6D показаны исследования влияния на клеточную пролиферацию соединения 2 в комбинации со стандартным лечением в клетках множественной миеломы RPMI8226 (фиг. 6A), клетках множественной миеломы H929 (фиг. 6B), клетках лимфомы Беркитта GA-10 (фиг. 6C) и клетках фолликулярной лимфомы (фиг. 6D).

[00036] На фиг. 7A и 7B показано влияние соединения 2 в комбинации с аспарагиназой на уровне ATF4 при измерении активности GCN2 в *in vivo* модели PK/PD. На фиг. 7A показаны графики данных в отношении результатов, полученных в исследованиях модели PK/PD, и на фиг. 7B представлены результаты в табличной форме.

[00037] На фиг. 8 представлен график, показывающий влияние соединения 2 в комбинации с аспарагиназой на рост опухоли в модели ксенотрансплантата MV-4-11.

[00038] На фиг. 9А показано влияние соединения 2 в анализе активации рекомбинантного GCN2 при измерении активности рекомбинантного фермента GCN2 *in vitro*.

[00039] На фиг. 9В показано влияние соединения 2 в анализе активации рекомбинантного PERK при измерении активности рекомбинантного фермента PERK *in vitro*.

[00040] На фиг. 10А, 10В и 10С показано влияние соединения 2 на ISR и пути апоптоза в клеточных линиях рака с солидными опухолями (фиг. 10А, H2030; фиг. 10В, H358; фиг. 10С, HT-1080).

[00041] На фиг. 11А, 11В и 11С показано действие соединения 2 в анализе пролиферации сфероидов. На фиг. 11А проиллюстрирована регрессия клеток в сфероиде солидной опухоли H2030 под действием соединения 2 в качестве единственного агента в сфероиде солидной опухоли H2030. На фиг. 11В и 11С показано влияние соединения 2 на клеточную пролиферацию в сфероиде солидных опухолей H358 (фиг. 11В) и HT-1080 (фиг. 11С) в качестве единственного агента.

[00042] На фиг. 12А, 12В и 12С проиллюстрировано влияние соединения 2 в комбинации со стандартными средствами лечения для подавления роста сфероидов. На фиг. 12А представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероиде NSCLC H2030, обработанных титром соединения 2 в комбинации с соторасибом или без него. На фиг. 12В представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероиде NSCLC H2030, обработанных титром соединения 2 в комбинации с соторасибом или без него. На фиг. 12С представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероиде NSCLC H2030, обработанных титром соединения 2 в комбинации с траметинибом или без него.

[00043] Фиг. 13А, 13В и 13С демонстрируют действие соединения 2 в анализе нокдауна кшРНК HT-1080. На фиг. 13А проиллюстрирован нокдаун GCN2 и PERK с применением нацеливающих кшРНК в клеточной линии HT-1080. Фиг. 13В представляет собой количественное определение сигнала ATF4 с помощью вестерн-блоттинга. На фиг. 13С проиллюстрировано действие соединения 2 в отношении ингибирования роста сфероидов.

[00044] На фиг. 14А и 14В показано действие соединения 2 в модели PK/PD ксенотрансплантата фибросаркомы HT-1080. На фиг. 14А показана повышающая регуляция уровней ATF4 под действием соединения 2 в различных дозах. На фиг. 14В показаны соответствующие уровни соединения 2 в плазме крови в различные моменты времени после введения дозы.

[00045] На фиг. 15А и 15В показано действие соединения 2 в модели эффективности в ксенотрансплантате HT-1080. На фиг. 15А показано влияние соединения 2 на рост опухоли в модели ксенотрансплантата колоректального рака LoVo, а на фиг. 15В показано влияние соединения 2 на рост опухоли в модели ксенотрансплантата

фибросаркомы НТ-1080.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[00046] Признаки и другие детали настоящего изобретения более подробно описаны ниже. Определенные термины, применяемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, собраны в данном разделе. Такие определения следует читать в контексте остальной части описания настоящего изобретения и в значении, понимаемом специалистом в данной области техники. Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, в котором они обычно понимаются специалистом в данной области техники.

#### *Определения*

[00047] Определения, представленные в данной заявке, предназначены для пояснения терминов, применяемых на протяжении всего объема данной заявки.

[00048] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, в котором они обычно понимаются специалистом в данной области, к которой относится объект настоящего изобретения. Используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения, если не указано иное, следующие термины имеют значение, указанное с целью облегчения понимания настоящего изобретения.

[00049] Когда показано, что связь с заместителем пересекает связь, соединяющую два атома в кольце, тогда такой заместитель может быть связан с любым атомом в кольце. Когда заместитель приводят без указания атома, через который такой заместитель связан с остальной частью соединения данной формулы, тогда такой заместитель может быть связан через любой атом в таком заместителе. Комбинации заместителей, положений заместителей и/или переменных допустимы, если такие комбинации приводят в результате к получению устойчивых соединений.

[00050] Используемые в данном документе формы единственного числа охватывают ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает на иное.

[00051] Используемый в данном документе термин «в данном документе» означает всю заявку.

[00052] Используемый в данном документе термин «дейтерированный» означает, что по меньшей мере один атом водорода заменен дейтерием. В любом образце дейтерированного соединения некоторые отдельные молекулы соединения, скорее всего, будут содержать водород, а не дейтерий, в указанном положении. Однако процент молекул дейтерированного соединения, содержащих дейтерий в указанном положении, будет намного выше, чем встречается в природе. Содержание дейтерия в дейтерированном положении является повышенным.

[00053] Используемые в данном документе термины «необязательный» или «необязательно» означают, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти или не произойти и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходят, а также случаи, когда они не происходят. Например,

«необязательно замещенный алкил» относится к алкилу, который может быть замещен, а также к незамещенному алкилу.

[00054] Понятно, что заместители и схемы замещения в описанных соединениях могут быть выбраны специалистами обычной квалификации в данной области техники с получением химически устойчивых соединений, которые можно легко синтезировать с помощью способов, известных из уровня техники, а также с помощью способов, изложенных ниже, из легкодоступных исходных материалов. Если заместитель сам замещен более чем одной группой, подразумевается, что эти несколько групп могут находиться при одном и том же атоме углерода или при разных атомах углерода, при условии получения в результате устойчивой структуры.

[00055] Используемый в данном документе термин «необязательно замещенный» относится к замещению одного-шести атомов водорода в данной структуре радикалом определенного заместителя, включая без ограничения: гидроксид, гидроксильный алкил, алкоксид, галоген, алкил, арил, циклоалкил, гетероцикл, амин, аминный алкил, циано, галогенный алкил, галогенный алкоксид,  $-OC(=O)-CH_2-$ Алкил. Предпочтительно «необязательно замещенный» относится к замещению одного-четырех атомов водорода в данной структуре указанными выше заместителями. Более предпочтительно один-три атома водорода замещены заместителями, упомянутыми выше. Понятно, что заместитель может быть дополнительно замещен.

[00056] Используемый в данном документе термин «замещенный» относится к фрагментам, содержащим заместители, замещающие водород при одном или нескольких атомах углерода главной цепи. Следует понимать, что «замещение» или «замещено» включает неявное условие, что такое замещение соответствует разрешенной валентности замещенного атома и заместителя и что замещение приводит к получению устойчивого соединения, например, которое не подвергается самопроизвольному преобразованию, такому как перегруппировка, циклизация, отщепление и т. д. Предполагается, что используемый в данном документе термин «замещенный» включает все допустимые заместители органических соединений. В широком аспекте допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Допустимые заместители могут быть в количестве одного или более и одинаковыми или разными для подходящих органических соединений. Для целей данной заявки гетероатомы, такие как азот, могут содержать водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанных в данном документе, которые удовлетворяют валентностям гетероатомов.

[00057] Заместители могут включать любые заместители, описанные в данном документе, например, такие заместители, если не указано иное, могут включать, например, галоген, гидроксид, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), алкоксид, амин, амидо, имин, циано, сульфонил, гетероцикл, алкил, гетероалкил или ароматический или гетероароматический фрагмент. Специалистам в

данной области техники будет понятно, что заместители сами могут быть замещены, если это является целесообразным. Например, заместители замещенного алкила могут включать замещенные и незамещенные формы amino, амидо, сульфонила и также эфиры, карбонилы (включая карбоксилаты и сложные эфиры),  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$  и т. п. Если конкретно не указано «незамещенный», ссылки на химические фрагменты в данном документе следует понимать как включающие замещенные варианты. Например, ссылка на «арильную» группу или фрагмент неявно включает как замещенные, так и незамещенные варианты.

[00058] Используемый в данном документе термин «алкил» относится к неароматическому углеводороду с прямой или разветвленной цепью, который является полностью насыщенным. Как правило, алкильная группа с прямой или разветвленной цепью содержит от 1 до примерно 20 атомов углерода, предпочтительно от 1 до примерно 10, например, может быть  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$ алкилом или, например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ алкилом, если не указано иное. Примеры алкильных групп с прямой и разветвленной цепью включают без ограничения метил, этил, 1-пропил (н-пропил), 2-пропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, неопентил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 1-гептил, 2-гептил, 3-гептил, 4-гептил, 1-октил, 2-октил, 3-октил или 4-октил и т. п. Более того, термин «алкил», используемый в описании, примерах и формуле изобретения, включает как «незамещенные алкилы», так и «замещенные алкилы», последний из которых относится к алкильным фрагментам, содержащим заместители, замещающие водород при одном или более атомах углерода главной углеводородной цепи. «Алкильная» группа может быть необязательно замещена.

[00059] Термин « $\text{C}_x$ - $\text{C}_y$ » при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, означает включение групп, которые содержат от  $x$  до  $y$  атомов углерода в цепи. Например, термин « $\text{C}_x$ - $\text{C}_y$ » относится к замещенным или незамещенным насыщенным углеводородным группам, включая алкильные группы с прямой и разветвленной цепью, которые содержат от  $x$  до  $y$  атомов углерода в цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил и т. д.  $\text{C}_0$  алкил указывает на атом водорода, где группа находится в концевом положении, связь, если она внутренняя.

[00060] Термин «алкенил» в данном контексте относится к ненасыщенному прямому или разветвленному углеводороду, имеющему по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Иллюстративные алкенильные группы включают без ограничения прямую или разветвленную группу из 2-6 или 3-4 атомов углерода, соответственно названные в данном документе как  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ алкенил и  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$ алкенил. Иллюстративные алкенильные группы включают без ограничения винил, аллил, бутенил, пентенил и т. д.

[00061] Термин «алкинил» в данном контексте относится к ненасыщенному прямому или разветвленному углеводороду, имеющему по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Иллюстративные алкинильные группы включают без ограничения прямые или разветвленные группы из 2-6 или 3-6 атомов углерода,

соответственно названные в данном документе как C<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>алкинил и C<sub>3</sub>-С<sub>6</sub>алкинил. Иллюстративные алкинильные группы включают без ограничения этинил, пропинил, бутинил, пентинил, гексинил, метилпропинил и т. д.

[00062] Используемый в данном документе термин «алкокси» относится к насыщенному алифатическому (алкильному) углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, связанному с атомом кислорода, который присоединен к основной структуре. Предпочтительно алкоксигруппы содержат один-шесть атомов углерода, т. е. могут представлять собой C<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкокси. Примеры алкоксигрупп включают без ограничения метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, трет-бутокси, пентокси, 3-метилбутокси и т. п.

[00063] Используемый в данном документе термин «алкоксиалкил» относится к алкильной группе (как определено выше), замещенной алкоксигруппой, и может быть представлен общей формулой алкил-О-алкил. Примеры алкоксиалкильных групп включают без ограничения метил-О-этилен-, этил-О-этилен-.

[00064] Используемый в данном документе термин «галогеналкил» относится к алкильной группе (как определено выше), замещенной одним или более галогенами. Моногалогеналкильный радикал, например, может содержать атом хлора, брома, йода или фтора. Дигалоген- и полигалогеналкильные радикалы могут содержать два или более одинаковых или разных атомов галогена. Примеры галогеналкила включают без ограничения хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, дихлорэтил, дихлорпропил, фторметил, дифторметил, трифторметил, пентафторэтил, гептафторпропил, дифторхлорметил, дихлорфторметил, дифторэтил, дифторпропил и т. п.

[00065] Используемый в данном документе термин «галогеналкокси» относится к радикалам, в которых один или более атомов водорода алкоксигруппы замещены одним или более атомами галогена. Иллюстративные примеры «галогеналкоксильных» групп включают без ограничения дифторметокси (-OCHF<sub>2</sub>), трифторметокси (-OCF<sub>3</sub>) или трифторэтокси (-OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>).

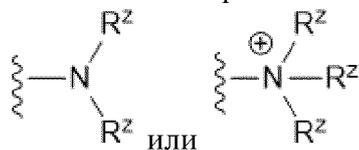
[00066] Используемый в данном документе термин «арил» включает замещенные или незамещенные однокольцевые ароматические группы, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, содержащие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец (конденсированных колец), при этом по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Термин «конденсированный» означает, что второе кольцо присоединено или образовано благодаря наличию двух смежных атомов, общих с первым кольцом. Термин «конденсированный» эквивалентен термину «сочлененный». Примеры арильных групп включают без ограничения фенил, нафтил, фенантрин, фенол, анилин, инданол,

дигидробензофуранил, дигидроизобензофуранил, индолинил, изоиндолинил и т. п. Если не указано иное, описанные в данном документе арильные группы могут быть необязательно замещены.

[00067] Используемые в данном документе, термины «полициклил», «полицикл» и «полициклический» относятся к двум или более кольцам (например, циклоалкилам, циклоалкенилам, циклоалкинилам, арилам, гетероарилам и/или гетероциклилам), в которых один или более атомов являются общими для двух смежных колец, например, кольца представляют собой «конденсированные кольца». Каждое из колец полицикла может быть замещенным или незамещенным. В некоторых вариантах осуществления каждое кольцо полицикла содержит 3-10 атомов в кольце, предпочтительно 5-7.

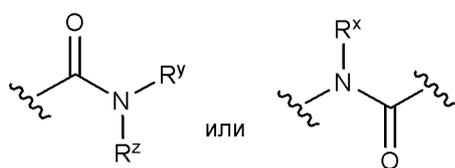
[00068] Используемый в данном документе термин «ацил» относится к группе  $C(=O)-R^w$ , где  $R^w$  необязательно замещен алкилом. Примеры «ацила» включают без ограничения случаи, где  $R^w$  представляет собой  $C_1-C_{10}$ алкил( $C_1-C_{10}$ ацил) или  $C_1-C_6$ алкил( $C_1-C_6$ ацил). В некоторых вариантах осуществления каждый случай необязательно замещенного заместителя независимо выбран из группы, состоящей из H, OH, алкокси, циано, F и amino. Дополнительные примеры «ацила» включают  $-C(=O)-CH_3$ ,  $-C(=O)-CH_2-CH_3$ ,  $-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_3$  или  $-C(=O)-CH(CH_3)_2$ .

[00069] Используемые в данном документе термины «амин» и «амино» относятся как к незамещенным, так и к замещенным аминам и их солям, например, фрагменту, который может быть представлен:



где каждый  $R^z$  независимо представляет собой водород или углеводородную группу, или группы  $Rz$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл, содержащий 4-8 атомов в кольцевой структуре.

[00070] Используемые в данном документе термины «амид» и «амидо» относятся к группе, представленной



где каждый  $R^x$ ,  $R^y$  и  $R^z$  независимо представляет собой водород или углеводородную группу, или  $R^y$  и  $R^z$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероциклил, содержащий 4-8 атомов в кольцевой структуре.

[00071] Используемый в данном документе термин «ациламино» относится к аминогруппе, как определено выше, замещенной ацильной группой.

[00072] Используемый в данном документе термин «аминокарбонил» относится к карбонильной группе, замещенной аминогруппой.

[00073] Используемый в данном документе термин «алкенилалкил» относится к алкильной группе, замещенной алкенильной группой.

[00074] Используемый в данном документе термин «алкинилалкил» относится к алкильной группе, замещенной алкинильной группой.

[00075] Используемый в данном документе термин «алкиламино» относится к аминогруппе, как определено выше, замещенной по меньшей мере одной алкильной группой.

[00076] Используемый в данном документе термин «аминоалкил» относится к алкильной группе, замещенной аминогруппой.

[00077] Используемый в данном документе термин «амидоалкил» относится к алкильной группе, замещенной амидогруппой.

[00078] Используемый в данном документе термин «цианоалкил» относится к алкильной группе, замещенной цианогруппой.

[00079] Используемый в данном документе термин «циклоалкоксиалкил» относится к алкильной группе (как определено выше), замещенной циклоалкоксигруппой, и может быть представлен общей формулой циклоалкил-О-алкил. Примеры циклоалкоксиалкильных групп включают без ограничения циклопропил-О-метилен-, циклопропил-О-этилен.

[00080] Используемый в данном документе термин «циклоалкилалкил» относится к алкильной группе, замещенной циклоалкильной группой.

[00081] Используемый в данном документе термин «гетероарилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероарильной группой.

[00082] Используемый в данном документе термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклильной группой.

[00083] Используемый в данном документе термин «гидроксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной гидроксигруппой.

[00084] Используемый в данном документе термин «циклоалкил» сам по себе или в сочетании с другим(другими) термином(терминами) относится к циклическому углеводороду, который является полностью насыщенным. «Циклоалкил» включает моноциклические, бициклические и трициклические кольца. Как правило, моноциклическая циклоалкильная группа содержит от 3 до примерно 10 атомов углерода, чаще 3-8 атомов углерода (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>циклоалкил или, например, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>циклоалкил, если не указано иное). Примеры моноциклических циклоалкилов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и т. п. Второе кольцо бициклического циклоалкила или второе или третье кольца трициклического циклоалкила могут быть выбраны из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. Циклоалкил включает бициклические и трициклические молекулы, в которых один, два или три или более атомов являются общими для двух колец. Циклоалкилы могут быть дополнительно

замещены алкилами, алкенилами, алкокси, аминоалкилами, карбонилзамещенными алкилами,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$  и т. п.

[00085] Используемый в данном документе термин «циклоалкилалкил» относится к алкильной группе, замещенной циклоалкильной группой.

[00086] Используемый в данном документе термин «циано» относится к  $-\text{CN}$ -группе.

[00087] Используемый в данном документе термин «гидрокси» или «гидроксил» относится к  $-\text{OH}$ -группе.

[00088] Используемый в данном документе термин «галогено» или «галоген» сам по себе или в сочетании с другим(другими) термином(терминами) означает хлор, фтор, бром и йод.

[00089] Используемый в данном документе термин «гетероатом» относится к атому любого элемента, отличного от углерода или водорода. Иллюстративные гетероатомы представляют собой азот (N), кислород (O), серу (S) и кремний (Si).

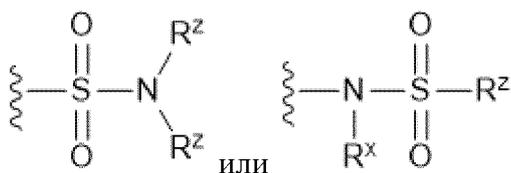
[00090] Используемые в данном документе термины «гетероцикл», «гетероциклоалкил», «гетероцикл» и «гетероциклический» относятся к неароматической, насыщенной или частично насыщенной, в том числе моноциклической, полициклической (например, бициклической, трициклической) мостиковой или конденсированной кольцевой системе из 3-15 членов, содержащей по меньшей мере один гетероатом или гетерогруппу, выбранные из O, N, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, NH или C(O), при этом остальные кольцевые атомы независимо выбраны из группы, состоящей из углерода, кислорода, азота и серы. Примеры «гетероциклоалкила» включают без ограничения азетидинил, оксетанил, имидазолидинил, пирролидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, пиразолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, морфолинил, тиоморфолинил, 1,4-диоксанил, диоксидотиоморфолинил, оксапиперазинил, оксапиперидинил, тетрагидрофурил, тетрагидропиранил, тетрагидротиофенил, дигидропиранил, индолинил, индолинилметил, 2-азабицикло[2.2.2]октанил, азоцинил, хроманил, ксантенил и их N-оксиды. Присоединение гетероциклоалкильного заместителя может происходить либо через атом углерода, либо через гетероатом. Гетероциклоалкильная группа может быть необязательно замещена одной или более подходящими группами из одной или более указанных выше групп. Предпочтительно «гетероциклоалкил» относится к 5-6-членному кольцу, выбранному из группы, состоящей из азетидинила, оксетанила, имидазолидинила, пирролидинила, оксазолидинила, тиазолидинила, пиразолидинила, тетрагидрофуранила, пиперидинила, пиперазинила, тетрагидропиранила, морфолинила, тиоморфолинила, 1,4-диоксанила и их N-оксидов. Более предпочтительно «гетероциклоалкил» включает азетидинил, пирролидинил, морфолинил и пиперидинил. Гетероциклоалкил необязательно замещен одной или более указанными выше группами.

[00091] Используемый в данном документе термин «гетероарил» относится к замещенным или незамещенным ароматическим одиночным кольцевым структурам,

предпочтительно 5-7-членным кольцам, более предпочтительно 5-6-членным кольцам, кольцевые структуры которых содержат по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно один-четыре гетероатома, более предпочтительно один или два гетероатома. Термин «гетероарил» также относится к замещенным или незамещенным ароматическим или частично ароматическим кольцевым системам, содержащим по меньшей мере один гетероатом и содержащим два или более циклических колец (бициклических, трициклических или полициклических), содержащих 8-20 кольцевых атомов, предпочтительно 5-10 кольцевых атомов, которые могут быть связаны ковалентно, или конденсированы, в которых два или более атомов являются общими для двух смежных колец, при этом по меньшей мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Кольца могут содержать атом N или S, где атом N или S необязательно окислен, или атом N необязательно кватернизован. Все гетероарилы являются необязательно замещенными. Любое подходящее положение кольца гетероарильного фрагмента может быть ковалентно связано с определенной химической структурой. Примеры гетероарила включают без ограничения: фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, оксазолил, циннолинил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, 1H-тетразолил, оксадиазолил, тиадиазолил, триазолил, пиридил, пиримидинил, пиразинил, пиридазинил, триазинил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензотиазолил, бензофуранил, бензотиенил, бензотриазинил, фталазинил, тиантрен, дибензофуранил, дибензотиенил, бензимидазолил, индолил, изоиндолил, индазолил, хинолинил, изохинолинил, хиназолинил, хиноксалинил, пуринил, птеридинил, 9H-карбазолил, альфа-карболин, индолизинил, бензоизотиазолил, бензоксазолил, пирролопиридил, фуропиридинил, пуринил, бензотиадиазолил, бензоксадиазолил, бензотриазаолил, бензотриадиазолил, карбазолил, дибензотиенил, акридинил и т. п.

[00092] Используемый в данном документе термин «углеводородный радикал» относится к группе, которая связана посредством атома углерода, который не содержит заместитель =O или =S и обычно содержит по меньшей мере одну углерод-водородную связь и в основном углеродный остов, но может необязательно содержать гетероатомы. Таким образом, такие группы как метил, этоксиэтил, 2-пиридил и трифторметил считаются углеводородными для целей настоящей заявки, но такие заместители как ацетил (который содержит заместитель =O в связанном углероде) и этокси (который связан посредством кислорода, а не углерода), не являются таковыми. Углеводородные группы включают без ограничения арил, гетероарил, циклоалкил, гетероциклил, алкил, алкенил, алкинил и их комбинации.

[00093] Используемый в данном документе термин «сульфонамид» представлен:



где  $R^z$  в каждом случае независимо представляет собой водород, алкил или циклоалкильную группу, или группы  $R^z$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл, содержащий 4-8 атомов в кольцевой структуре.

[00094] Используемый в данном документе термин «сульфонил» относится к группе  $-S(O)_2-R^{6d}$ , где  $R^{6d}$  представляет собой алкил или циклоалкил.

[00095] «Комбинированная терапия» представляет собой лечение, которое включает введение двух или более терапевтических средств, например, соединения формулы I и фермента аспарагиназы (ASНазы) или их производного, пациенту, нуждающемуся в этом.

[00096] «Заболевание», «нарушение» и «патологическое состояние» использованы в данном документе взаимозаменяемо.

[00097] «Индивид», «пациент» или «субъект» использованы взаимозаменяемо и включают любое животное, в том числе млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупный рогатый скот, овец, лошадей или приматов, и наиболее предпочтительно людей. Соединения, описанные в данном документе, можно вводить млекопитающему, такому как человек, однако также можно вводить другим млекопитающим, таким как животное, нуждающееся в ветеринарном лечении, например домашние животные (например, собаки, коты и т. п.), сельскохозяйственные животные (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и т. п.) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и т. п.).

[00098] Соединения, описанные в данном документе, применимы для лечения заболеваний, контролируемых GCN2 (иногда обозначаемых аббревиатурой «заболевание, ассоциированное с GCN2» в данном описании), например, рака [например, колоректального рака (например, колоректального рака, рака прямой кишки, рака анального канала, наследственного колоректального рака, наследственного неполипозного колоректального рака, гастроинтестинальной стромальной опухоли, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, злокачественной мезотелиомы), мезотелиомы, рака поджелудочной железы (например, рака протока поджелудочной железы, эндокринной опухоли поджелудочной железы), рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка (например, папиллярной аденокарциномы, муцинозной аденокарциномы, аденосквамозной карциномы), рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы (например, инвазивной карциномы протоков, протоковой карциномы in situ, воспалительного рака молочной железы), рака яичников (например, эпителиальной карциномы яичников, внегонадной герминогенно-клеточной опухоли, эмбрионально-клеточной опухоли яичников, опухоли яичника с низким злокачественным потенциалом), опухоли яичка, рака

предстательной железы (например, гормонозависимого рака предстательной железы, негормонозависимого рака предстательной железы, кастрационно-резистентного рака предстательной железы), рака печени (например, гепатомы, первичного рака печени, рака внепеченочного желчного протока), рака щитовидной железы (например, медуллярной карциномы щитовидной железы), рака почки (например, почечно-клеточной карциномы (например, светлоклеточной почечно-клеточной карциномы), карциномы переходных клеток почечной лоханки и мочеточника), рака матки (например, рака шейки матки, рака тела матки, саркомы матки), хориокарциномы матки, опухоли головного мозга (например, медуллобластомы, глиомы, пинеальной астроцитомы, пилоцитарной астроцитомы, диффузной астроцитомы, анапластической астроцитомы, гипофизарной аденомы), ретинобластомы, рака кожи (например, базальноклеточной карциномы, злокачественной меланомы, меланомы)), саркомы (например, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, саркомы мягких тканей, веретенклеточной саркомы, остеосаркомы), злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластома (например, множественной миеломы, лейкоза, (например, острого миелоидного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза (включая бластный криз хронического лейкоза)), злокачественной лимфомы, болезни Ходжкина, хронического миелопролиферативного заболевания), рака неизвестной первичной локализации], ингибитора роста рака, ингибитора метастазирования рака, промотора апоптоза, а также для профилактики или лечения предраковых поражений (например, миелодиспластического синдрома костного мозга).

[00099] Соединения, описанные в данном документе, например, соединение формулы I, которое определено в данном документе, можно использовать в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами для лечения нарушения, описанного в данном документе, такого как рак, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с гормональными терапевтическими средствами, химиотерапевтическими средствами, иммунотерапевтическими средствами, лекарственными препаратами, ингибирующими действие фактора роста клеток и его рецептора, такими как ингибиторы PERK и ингибиторы аутофагии, фермент аспарагиназа (ASNaза) и т. п.

[000100] «Фармацевтически или фармакологически приемлемый» включает молекулярные объекты и композиции, которые не вызывают побочных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному или человеку, в зависимости от ситуации. Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты в соответствии с требованиями стандартов Отделения биологических препаратов FDA.

[000101] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество», используемый в данном документе, относится к любым возможным растворителям, дисперсным средам, покрытиям, изотоническим средствам и средствам, замедляющим абсорбцию, и т. п., которые являются

совместимыми с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ широко известно в уровне техники. Композиции могут также содержать другие активные соединения, предусматривающие дополняющие, дополнительные или усиленные терапевтические функции.

[000102] Термин «фармацевтическая композиция», используемый в данном документе, относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно соединение, описанное в данном документе, составленной вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

[000103] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая(приемлемые) соль(соли)» относится к солям, образуемым кислотными или основными группами, которые могут присутствовать в соединениях, используемых в композициях. Содержащиеся в композициях соединения, которые являются основными по своей природе, способны к образованию большого разнообразия солей с различными неорганическими и органическими кислотами. Кислоты, которые можно применять для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты из таких основных соединений, представляют собой кислоты, которые образуют нетоксичные соли присоединения кислоты, т. е. соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, в том числе без ограничения малатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, изоникотинатные, ацетатные, лактатные, салицилатные, цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизатные, fumarатные, глюконатные, глюкаронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, *n*-толуолсульфонатные и памоатные (т. е. 1,1'-метилена-*bis*-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Соединения, включенные в композиции по настоящему изобретению, которые являются кислотными по своей природе, способны к образованию основных солей с различными фармакологически приемлемыми катионами. Примеры таких солей включают соли щелочных или щелочноземельных металлов, в частности соли кальция, магния, натрия, лития, цинка, калия и железа. Соединения, включенные в композиции по настоящему изобретению, которые включают основной или кислотный фрагмент, могут также образовывать фармацевтически приемлемые соли с различными аминокислотами. Соединения по настоящему изобретению могут содержать как кислотные, так и основные группы; например одну аминогруппу и одну группу карбоновой кислоты. В таком случае соединение может существовать в виде соли присоединения кислоты, цвиттер-иона или основной соли.

[000104] Соединения по настоящему изобретению могут содержать один или более хиральных центров и, следовательно, существовать в виде стереоизомеров. Термин «стереоизомеры», при использовании в данном документе, включает все энантиомеры или диастереомеры. Такие соединения могут быть обозначены символом «*R*» или «*S*» в зависимости от конфигурации заместителей около стереогенного атома углерода, но

специалисту в данной области техники будет ясно, что структура может явно обозначать хиральный центр. Такие соединения могут быть обозначены «(+)» и «(-)» на основе их свойств оптического вращения. Описанные в настоящем изобретении соединения охватывают различные стереоизомеры таких соединений и их смесей. Смеси энантиомеров или диастереомеров могут быть обозначены символом «(±)» в номенклатуре, но специалисту в данной области будет ясно, что структура может явно обозначать хиральный центр.

[000105] В данном описании термин «терапевтически эффективное количество» означает количество соединения по настоящему изобретению, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы или животного (например, млекопитающего или человека), необходимый исследователю, ветеринару, врачу или другому медицинскому персоналу. Соединения, описанные в данном документе, вводят в терапевтически эффективных количествах для лечения нарушения.

[000106] «Лечение» включает любой эффект, например уменьшение, снижение, модулирование или устранение, который приводит к облегчению патологического состояния, заболевания, нарушения и т. п.

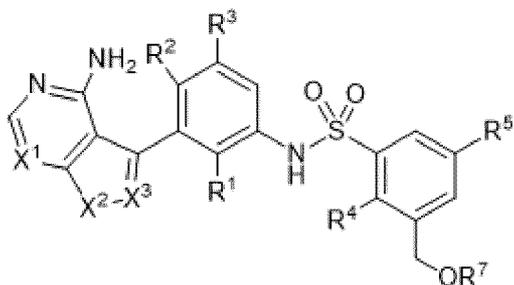
[000107] Настоящее изобретение также включает изотопно меченые соединения, которые являются идентичными указанным в данном документе, за исключением того, что один или более атомов заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, которые являются отличными от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в описанные соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора и хлора, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $^{36}\text{Cl}$ , соответственно. Например, соединение по настоящему изобретению может содержать один или более атомов H, замененных дейтерием.

[000108] Отдельные энантиомеры и диастереомеры описанных соединений могут быть получены путем синтеза из коммерчески доступных исходных материалов, которые содержат асимметричные или стереогенные центры, или путем получения рацемической смеси с последующим применением способов разделения, хорошо известных специалистам обычной квалификации в данной области техники. Такие способы разделения проиллюстрированы (1) присоединением смеси энантиомеров к хиральному вспомогательному реагенту, разделением полученной смеси диастереомеров путем перекристаллизации или хроматографии и высвобождением оптически чистого продукта из вспомогательного реагента, (2) образованием соли с использованием оптически активного разделительного средства, (3) прямым разделением смеси оптических энантиомеров на колонках для хиральной жидкостной хроматографии или (4) кинетическим разделением с применением стереоселективных химических или ферментативных реагентов. Рацемические смеси могут также быть превращены в составляющие их энантиомеры посредством широко известных способов, таких как хиральная жидкостная хроматография или кристаллизация соединения в хиральном

растворителе. Виды стереоселективного синтеза, химической или ферментативной реакции, в которой отдельное реагирующее вещество образует смесь стереоизомеров в неравных количествах во время образования нового стереоцентра или во время преобразования уже существующего, широко известны в уровне техники. Виды стереоселективного синтеза охватывают как энантио-, так и диастереоселективные преобразования, и могут включать применение хиральных вспомогательных веществ. Например, см. Carreira and Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

#### Соединения

[000109] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение, представленное формулой I-A:

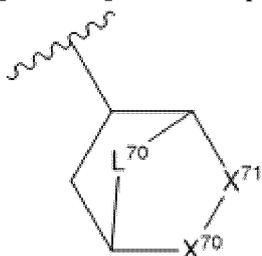


#### Формула I-A,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где: каждый из  $X^1$  и  $X^3$  независимо выбран из группы, состоящей из CH и N;  $X^2$  выбран из группы, состоящей из  $NR^6$ , O, и S; каждый из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано, и алкокси;  $R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;  $R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;  $R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенил, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и  $R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

[000110] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой фтор. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой фтор. В некоторых вариантах осуществления  $X^1$  представляет собой N.

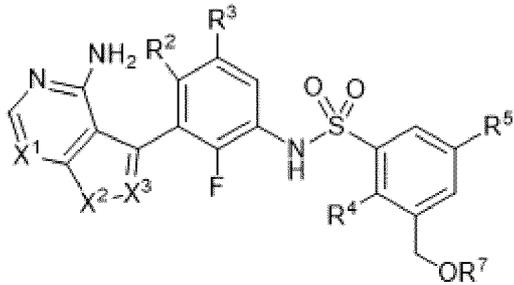
[000111] В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  не представляет собой:



где  $L^{70}$  представляет собой метилен или этилен, и один из  $X^{70}$  и  $X^{71}$  представляет

собой  $\text{CH}_2$ , а другой представляет собой  $\text{N-CO-R}^{101}$ , где  $\text{R}^{101}$  представляет собой  $\text{C}_{1-4}$ алкил;  $\text{C}_{2-4}$ алкенил; или  $\text{C}_{2-4}$ алкинил, каждый из которых является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, циано, гидроксид, амино,  $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ алкила),  $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ алкила) $_2$ ,  $\text{C}_{3-10}$ циклоалкила и  $\text{C}_{3-10}$ гетероциклоалкила, содержащего один или два гетероатома, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из азота и кислорода.

[000112] В другом варианте осуществления в данном документе описано соединение, представленное формулой I-B:

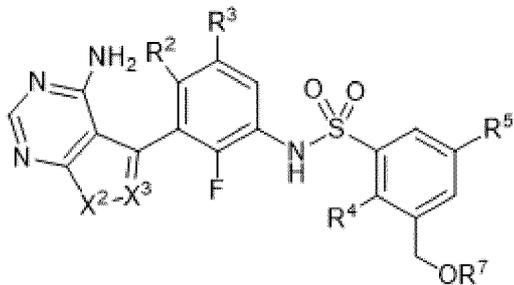


Формула I-B,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где: каждый из  $\text{X}^1$  и  $\text{X}^3$  независимо выбран из группы, состоящей из  $\text{CH}$  и  $\text{N}$ ;  $\text{X}^2$  выбран из группы, состоящей из  $\text{NR}^6$ ,  $\text{O}$ , и  $\text{S}$ ; каждый из  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  независимо выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , галогена, циано и алкокси;  $\text{R}^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;  $\text{R}^5$  выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , галогена и алкила;  $\text{R}^6$  выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и  $\text{R}^7$  выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , алкила и ацила.

[000113] В некоторых вариантах осуществления  $\text{X}^1$  представляет собой  $\text{N}$ .

[000114] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение, представленное формулой I-C:



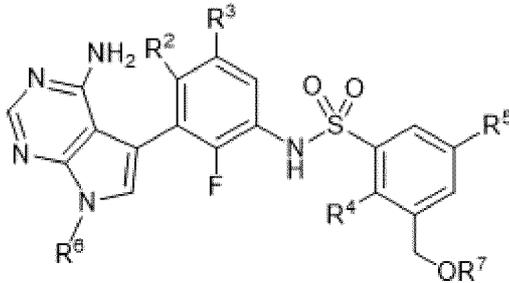
Формула I-C,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где:  $\text{X}^2$  выбран из группы, состоящей из  $\text{NR}^6$ ,  $\text{O}$  и  $\text{S}$ ;  $\text{X}^3$  выбран из группы, состоящей из  $\text{CH}$  и  $\text{N}$ ; каждый из  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  независимо выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , галогена, циано, и алкокси;  $\text{R}^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;  $\text{R}^5$  выбран из группы, состоящей из  $\text{H}$ , галогена и алкила;  $\text{R}^6$  выбран из группы,

состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и  $R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

[000115] В некоторых вариантах осуществления  $X^2$  представляет собой  $NR^6$ .

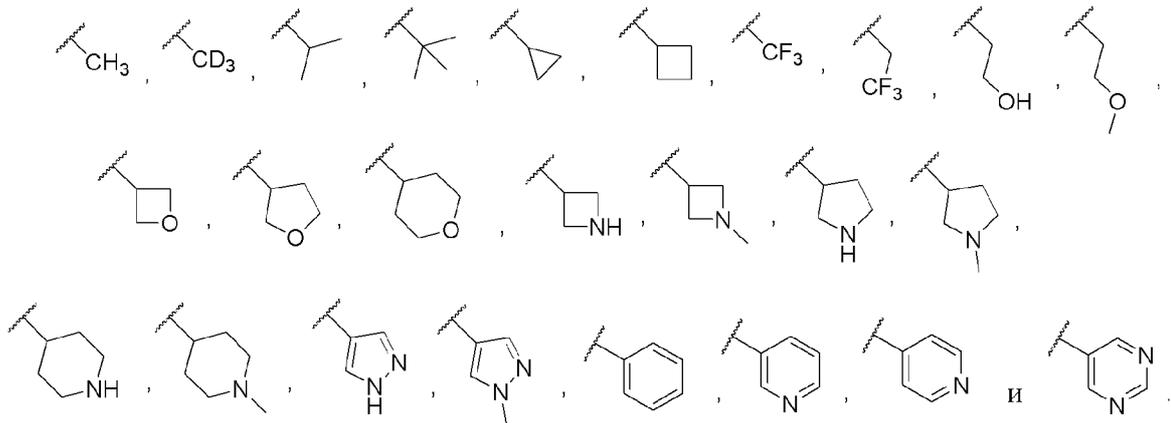
[000116] В другом варианте осуществления в данном документе описано соединение, представленное формулой I-D:



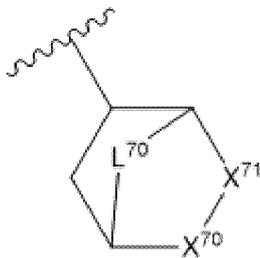
Формула I-D,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где: каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано и алкокси;  $R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;  $R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;  $R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и  $R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацетата.

[000117] В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой H, и  $R^3$  представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой F, и  $R^3$  представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой H, и  $R^3$  представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  выбран из группы, состоящей из  $(C_1-C_8)$ алкила,  $(C_2-C_8)$ алкенила,  $(C_2-C_8)$ алкенил- $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_2-C_8)$ алкинила,  $(C_2-C_8)$ алкинил- $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкил- $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ алкокси- $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкенила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкенил- $(C_1-C_4)$ алкила, гетероциклила, гетероциклил- $(C_1-C_4)$ алкила, арила, гетероарила и гетероарил- $(C_1-C_4)$ алкила. В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  выбран из группы, состоящей из  $(C_1-C_8)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкила,  $(C_3-C_8)$ алкокси- $(C_1-C_4)$ алкила, гетероциклила и гетероарила. В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  выбран из группы, состоящей из:



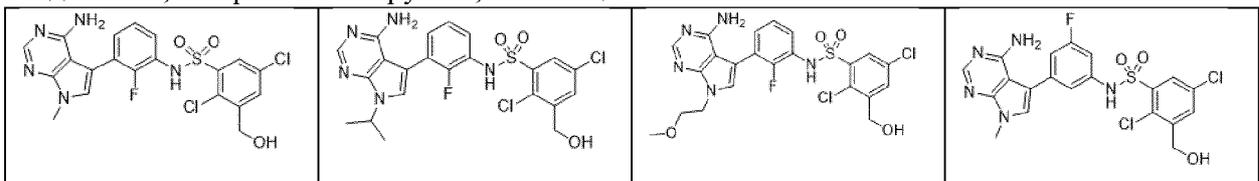
[000118] В некоторых вариантах осуществления  $R^6$  не представляет собой:

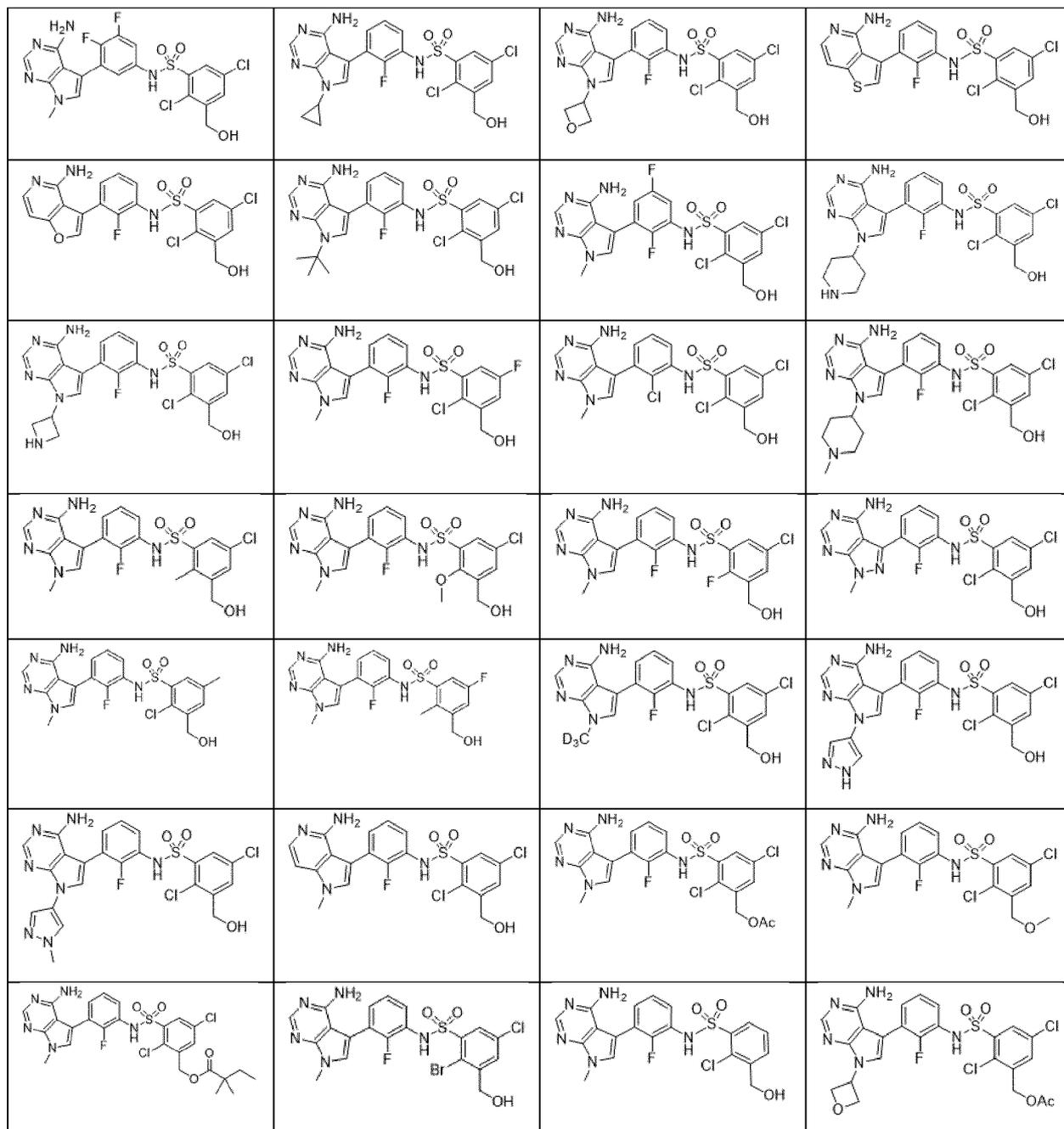


где  $L^{70}$  представляет собой метилен или этилен, и один из  $X^{70}$  и  $X^{71}$  представляет собой  $CH_2$ , а другой представляет собой  $N-CO-R^{101}$ , где  $R^{101}$  представляет собой  $C_{1-4}$ алкил;  $C_{2-4}$ алкенил; или  $C_{2-4}$ алкинил, каждый из которых является незамещенным или замещен одним-тремя заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, циано, гидроксид, амино,  $NH(C_{1-4}$ алкила),  $N(C_{1-4}$ алкила) $_2$ ,  $C_{3-10}$ циклоалкила и  $C_{3-10}$ гетероциклоалкила, содержащего один или два гетероатома, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из азота и кислорода.

[000119] В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена,  $(C_1-C_6)$ алкокси и  $(C_1-C_6)$ алкила. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  выбран из группы, состоящей из хлора, фтора, метокси и метила. В некоторых вариантах осуществления  $R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и  $(C_1-C_6)$ алкила. В некоторых вариантах осуществления  $R^5$  выбран из группы, состоящей из хлора, фтора и метила. В некоторых вариантах осуществления  $R^7$  представляет собой H.

[000120] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение, выбранное из группы, состоящей из:





и их фармацевтически приемлемых солей, энантимеров, стереоизомеров и таутомеров.

### Способы лечения

[000121] Соединения, описанные в данном документе, например, соединения формулы I, как определено в данном документе, могут выступать в качестве терапевтических средств при заболеваниях, контролируемых киназой GCN2 или PERK, и применимы для лечения заболеваний и нарушений, таких как рак, у нуждающихся в этом пациентов. Иллюстративные примеры рака включают без ограничения колоректальный рак, рак прямой кишки, рак анального канала, наследственный колоректальный рак, наследственный неполипозный колоректальный рак, гастроинтестинальную стромальную опухоль, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественную мезотелиому), мезотелиому, рак поджелудочной железы

(например, рак протока поджелудочной железы, эндокринную опухоль поджелудочной железы), рак глотки, рак гортани, рак пищевода, рак желудка (например, папиллярную аденокарциному, муцинозную аденокарциному, аденосквамозную карциному), рак двенадцатиперстной кишки, рак тонкой кишки, рак молочной железы (например, инвазивную карциному протоков, протоковую карциному *in situ*, воспалительный рак молочной железы), рак яичников (например, эпителиальную карциному яичников, внегонадную герминогенно-клеточную опухоль, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом), опухоль яичка, рак предстательной железы (например, гормонозависимый рак предстательной железы, негормонозависимый рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы), рак печени (например, гепатому, первичный рак печени, рак внепеченочного желчного протока), рак щитовидной железы (например, медуллярную карциному щитовидной железы), рак почки (например, почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточную почечно-клеточную карциному), карциному переходных клеток почечной лоханки и мочеточника), рак матки (например, рак шейки матки, рак тела матки, саркому матки), хориокарциному матки, опухоль головного мозга (например, медуллобластому, глиому, пинеальную астроцитому, пилоцитарную астроцитому, диффузную астроцитому, анапластическую астроцитому, гипофизарную аденому), ретинобластому, рак кожи (например, базальноклеточную карциному, злокачественную меланому, меланому), саркому (например, рабдомиосаркому, лейомиосаркому, саркому мягких тканей, веретенклеточную саркому, остеосаркому), фибросаркому, злокачественную опухоль кости, рак мочевого пузыря, гемобластоз (например, множественную миелому, лейкоз, острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), включая бластный криз хронического лейкоза), злокачественную лимфому, болезнь Ходжкина, хроническое миелопролиферативное заболевание), рак неизвестной первичной локализации], ингибитор роста рака, ингибитор метастазирования рака, промотор апоптоза, а также для профилактики или лечения предраковых поражений (например, миелодиспластического синдрома костного мозга).

[000122] Также в одном варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанных в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено киназой GCN2. В некоторых вариантах

осуществления нарушение регуляции реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы PERK.

[000123] Также в одном варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанных в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено активацией киназы, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции реакции несвернутых белков обусловлено активацией киназы PERK.

[000124] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000125] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ активации киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000126] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ модулирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000127] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ активации киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000128] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ ингибирования активности киназы GCN2 и ингибирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000129] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000130] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ ингибирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000131] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанного в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-

крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

[000132] В одном варианте осуществления в данном документе описан способ лечения амилоидоза у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В одном варианте осуществления в данном документе описан способ лечения амилоидоза легкой цепи у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[000133] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанных в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников,

опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

[000134] В другом варианте осуществления в данном документе описан способ лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе (например, соединения формул I-A, I-B, I-C и I-D, описанных в данном документе), или его фармацевтически приемлемой соли и терапевтически эффективного количества одного или более терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода,

рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобласто́за, лейко́за, острого миелоидного лейко́за, острого лимфобластного лейко́за, хронического лимфоцитарного лейко́за, хронического миелоидного лейко́за, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейко́за, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейко́з. В некоторых вариантах осуществления лейко́з представляет собой острый миелоидный лейко́з. В некоторых вариантах осуществления лейко́з представляет собой острый лимфобластный лейко́з. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из L-аспарагиназы, пегилированной аспарагиназы, ингибитора PERK, ингибитора mTOR, иммуномодулирующего средства, ингибитора пути MAPK, ингибитора MEK, ингибитора ERK и ингибитора Ras. В некоторых вариантах осуществления одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из IMiD-средства, ингибитора протеасом, стероида, средства на основе антитела к CD38, средства на основе антитела к CD20, ингибитора Bcl-2, ингибитора PI3K, биспецифического антитела, аналога нуклеозида, ингибитора ВТК, средства, алкилирующего ДНК, ингибитора EZH2, антрациклина, ингибитора топоизомеразы, платины, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора HDAC, ингибитора ядерного экспорта, средства, оказывающего воздействие на микротрубочки, L-аспарагиназы, пегилированной аспарагиназы, ингибитора PERK, ингибитора mTOR, иммуномодулирующего средства, ингибитора пути MAPK, ингибитора MEK, ингибитора ERK и ингибитора Ras. В некоторых вариантах осуществления одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из L-аспарагиназы, пэгаспаргазы, каласпаргазы пэгол-mnkl, бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, талидомида, помалидомида, леналидомида, дексаметазона, преднизона, даратумумаба, даратумумаба/гиалуронидазы, исатуксимаба, ритуксимаба, обинутузумаба, венетоклакса, иделалисиба, копанлисиба, дувелисиба, умбралисиба, гемцитабина, цитарабина, ибрутиниба, акалабрутиниба, занубрутиниба, бендамустина, циклофосамида, таземетостата, доксорубицина, даунорубицина,

этопозид, оксалоплатина, карбоплатина, цисплатина, бозутиниба, дазатиниба, иматиниба, нилотиниба, понатиниба, панобиностата, селинексора, винкристина, JZP-458, эриаспазы, PF745 (JZP-341), аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi* (крисантаспазы), аспарагиназы (коласпазы), средства на основе антитела к PD1, средства на основе антитела к PDL1 и средства на основе антитела к CTLA4.

[000135] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков, у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено киназой GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы GCN2. В некоторых вариантах осуществления нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс обусловлено активацией киназы PERK. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для активации киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для модулирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для активации киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

[000136] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая

композиция, описанная в данном документе, для применения для ингибирования киназы GCN2 и ингибирования киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для ингибирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

[000137] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластома, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

[000138] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения амилоидоза у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения амилоидоза легкой цепи у пациента, нуждающегося в этом.

[000139] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

[000140] В одном варианте осуществления в данном документе описано соединение или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения для лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из

колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления лейкоз представляет собой острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фибросаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из IMiD-средства, ингибитора протеасом, стероида, средства на основе антитела к CD38, средства на основе антитела к CD20, ингибитора Vcl-2, ингибитора PI3K, биспецифического антитела, аналога нуклеозида, ингибитора ВТК, средства, алкилирующего ДНК, ингибитора EZH2, антрацилина, ингибитора топоизомеразы, платины, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора HDAC, ингибитора ядерного экспорта, средства, оказывающего воздействие на микротрубочки, L-аспарагиназы, пегилированной аспарагиназы, ингибитора PERK, ингибитора mTOR, иммуномодулирующего средства, ингибитора пути MAPK, ингибитора MEK, ингибитора ERK и ингибитора Ras. В некоторых вариантах осуществления одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, талидомида, помалидомида, леналидомида, дексаметазона, преднизона, даратумумаба, даратумумаба/гиалуронидазы, исатуксимаба, ритуксимаба, обинутузумаба, венетоклакса, идегалисиба, копанлисиба, дувелисиба, умбралисиба, гемцитабина, цитарабина, ибрутиниба, акалабрутиниба, занубрутиниба, бендамустина, циклофосамида, таземетостата, доксорубицина, даунорубицина, этопозида, оксалоплатина, карбоплатина, цисплатина, бозутиниба, дазатиниба, иматиниба, нилотиниба, понатиниба, панобиностата, селинекса, винкристина, L-аспарагиназы, пэгаспаргазы, каласпаргазы пэгол-mnkl, JZP-458, эриаспазы, PF745 (JZP-341),

аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi* (крисантаспазы), аспарагиназы *Escherichia coli* (коласпазы), средства на основе антитела к PD1, средства на основе антитела к PDL1 и средства на основе антитела к CTLA4.

[000141] Соединения, предусмотренные в данном документе, могут быть введены пациентам (животным и людям), нуждающимся в таком лечении, в дозах, которые будут обеспечивать оптимальную фармацевтическую эффективность. Следует понимать, что доза, необходимая для использования в любом конкретном варианте применения, будет отличаться от пациента к пациенту, не только в зависимости от выбранного конкретного соединения или конкретной композиции, но также от способа введения, природы патологического состояния, подлежащего лечению, возраста и состояния пациента, сопутствующей лекарственной терапии или особой диеты, которой придерживается пациент, и других факторов, которые будут известны специалисту в данной области, при этом подходящая доза окончательно будет выбрана на усмотрение лечащего врача. Для лечения клинических состояний и заболеваний, указанных выше, соединение, предусмотренное в данном документе, может быть введено перорально, подкожно, наружно, парентерально, с помощью спрея для ингаляции или ректально с помощью единичных дозированных составов, содержащих традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества и инертные носители. Парентеральное введение может включать подкожные инъекции, внутривенные или внутримышечные инъекции или методики с применением инфузий.

[000142] Лечение может быть продолжено в течение периода, являющегося таким длительным или таким коротким, как это необходимо. Схема введения композиций может предусматривать, например, от одного до четырех и больше раз в сутки. Подходящим периодом лечения может являться, например, по меньшей мере примерно одна неделя, по меньшей мере примерно две недели, по меньшей мере примерно один месяц, по меньшей мере примерно шесть месяцев, по меньшей мере примерно 1 год или без ограничения срока. Период лечения может быть остановлен по достижении необходимого результата.

#### *Комбинированная терапия*

[000143] Соединения, описанные в данном документе, например, соединение формулы I, которое определено в данном документе, может быть введено в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами для лечения нарушения, описанного в данном документе, такого как рак, описанный в данном документе. Например, в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в данном документе, например, соединение формулы I, которое определено в данном документе, одно или более дополнительных терапевтических средств, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления вводят соединение формулы I, которое определено в данном документе, и одно дополнительное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления вводят соединение формулы I, которое определено в данном документе, и два дополнительных

терапевтических средства. В некоторых вариантах осуществления вводят соединение формулы I, которое определено в данном документе, и три дополнительных терапевтических средства. Эффект комбинированной терапии может быть достигнут путем введения двух или более терапевтических средств, каждое из которых составлено и вводится отдельно. Например, соединение формулы I, которое определено в данном документе, и дополнительное терапевтическое средство могут быть составлены и введены отдельно. Эффект комбинированной терапии также может быть достигнут путем введения двух или более терапевтических средств в одном составе, например, фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I в качестве одного терапевтического средства и одно или более дополнительных терапевтических средств, таких как химиотерапевтическое средство. Например, соединение формулы I, которое определено в данном документе, и дополнительное терапевтическое средство могут быть введены в одном составе. Другие комбинации также охватываются комбинированной терапией. Хотя два или более средств в составе комбинированной терапии можно вводить одновременно, это не является обязательным. Например, введение первого средства (или комбинации средств) может происходить раньше введения второго средства (или комбинации средств) на минуты, часы, дни или недели. Таким образом, два или более средств можно вводить с интервалом в несколько минут относительно друг друга, или с интервалом в 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 или 24 часа относительно друг друга, или с интервалом в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 дней относительно друг друга, или с интервалом 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или недель относительно друг друга. В некоторых случаях возможны даже более длительные интервалы. Хотя во многих случаях желательно, чтобы два или более средств, применяемых в комбинированной терапии, присутствовали в организме пациента в одно и то же время, это не является обязательным.

[000144] Комбинированная терапия также может включать два или более введений одного или более средств, применяемых в комбинации, с применением отличающейся последовательности средств, представляющих собой компоненты. Например, если средство X и средство Y применяют в комбинации, то их можно вводить последовательно в любой комбинации один или более раз, например в порядке X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y и т. д.

[000145] Комбинированная терапия также может включать два или более введений одного или более средств, применяемых в комбинации, с применением различных способов введения. Каждое из одного или более средств может быть независимо введено перорально, подкожно, наружно, парентерально, с помощью спрея для ингаляции или ректально с помощью единичных дозированных составов, содержащих традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества и среды-носители. Парентеральное введение может включать подкожные инъекции, внутривенные или внутримышечные инъекции или методики с применением инфузий.

[000146] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы I, как описано в данном документе, комбинируют с аспарагиназой (ASНазой, L-аспарагиназой)

или ее производными. В некоторых вариантах осуществления аспарагиназу получают из *Erwinia chrysanthemi*, и она известна как крисантаспаза или аспарагиназа *Erwinia chrysanthemi*. Аспарагиназа *Erwinia chrysanthemi* представлена в продаже под торговыми марками Erwinaze® или Erwinase®. В некоторых вариантах осуществления аспарагиназу получают из *Escherichia coli*, и она известна как коласпаза. Коласпаза представлена в продаже под торговыми марками Elspar®, Leunase®, Kidrolase® или Spectrila® (рекомбинантная аспарагиназа *E. coli*). Пегилированные производные коласпазы представляют собой пэгаспаргазу, в продаже под торговой маркой Oncaspar®, и каласпаргазу пэгол-mnkl, в продаже под торговой маркой Asparlas®. Другие продукты аспарагиназы, которые в настоящее время находятся в доклинической или клинической разработке, включают JZP-458 (рекомбинантную аспарагиназу *Erwinia*), PF745 (JZP-341), эриаспазу (GRASPA®) и Хонсанае.

[000147] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы I, как определено в данном документе, комбинируют с иммуномодулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор усиливает адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство усиливает активность антигенпрезентирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство усиливает противоопухолевую активность миелоидных клеток, включая макрофаги. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор усиливает противоопухолевую активность естественных клеток-киллеров. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство усиливает активность эффекторных Т-клеток, включая цитотоксические Т-клетки.

[000148] В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств, которые могут быть введены в комбинации с соединением, предусмотренным в данном документе, могут представлять собой ингибитор пути с участием MAPK. Такие ингибиторы пути с участием MAPK включают, например, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK и ингибиторы Ras.

[000149] Иллюстративные ингибиторы MEK включают без ограничения траметиниб, селуметиниб, кобиметиниб, биниметиниб и их фармацевтически приемлемые соли. Иллюстративные примеры ингибиторов ERK включают без ограничения уликсертиниб, SCH772984, LY3214996, равоксертиниб, VX-11e, ASN-007, GDC-0994, MK-8353, ASTX-029, LTT462, KO-947 и их фармацевтически приемлемые соли. Иллюстративные примеры ингибиторов Ras включают без ограничения AMG-510, MRTX849, ARS-1620, ARS-3248, LY3499446 и их фармацевтически приемлемые соли.

[000150] В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой иммуномодулирующие средства, включая без ограничения терапевтические средства на основе антитела к PD-1 или на основе антитела к PDL-1, включая пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, цемиплимаб, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559 или авелумаб. В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой терапевтические

средства на основе антитела к TIM3 (антитела к HAVcr2), включая без ограничения TSR-022 или MBG453, терапевтические средства на основе антитела к LAG3, включая без ограничения релатлимаб, LAG525 или TSR-033, антитело к 4-1BB (антитело к CD37, антитело к TNFRSF9), терапевтические средства на основе агониста CD40, включая без ограничения SGN-40, CP-870893 или RO7009789, терапевтические средства на основе антитела к CD47, включая без ограничения Hu5F9-G4, терапевтические средства на основе антитела к CD20, терапевтические средства на основе антитела к CD38, агонисты STING, включая без ограничения ADU-S100, MK-1454, ASA404 или амидобензимидазолы. В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой средства на основе антитела к CTLA4, включая ипилимумаб, тремелиумаб. В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой гипометилирующие средства, включая без ограничения азацитидин или децитабин, другие иммуномодулирующие терапевтические средства, включая без ограничения ингибиторы эпидермального фактора роста, статины, метформин, блокаторы рецепторов ангиотензина, талидомид, леналидомид, помалидомид, преднизон или дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой иммунотерапевтические средства, включая направленные терапевтические средства, противораковые вакцины и терапию CAR-T-клетками.

[000151] Соединения формулы I, как описано в данном документе, могут быть введены в комбинации с другими терапевтическими средствами, известными для лечения рака. Такие другие терапевтические средства включают лучевую терапию, антитубулиновые средства, ДНК-алкилирующие средства, средства, ингибирующие синтез ДНК, ДНК-интеркалирующие средства, антиэстрогенные средства, антиандрогены, стероиды, средства на основе антител к EGFR, ингибиторы киназы, ингибиторы mTOR, ингибиторы киназы PI3, циклинзависимые ингибиторы киназы, ингибиторы киназы CD4/CD6, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), ингибиторы метилирования ДНК, средства на основе антител к HER2, анти-ангиогенные средства, ингибиторы протеасом, ингибиторы PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы), ингибиторы киназы, регулирующей клеточный цикл, талидомид, леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, даратумумаб, даратумумаб/гиалуронидазу, исатуксимаб, дексаметазон и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC).

[000152] В одном варианте осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой химиотерапевтические средства, в том числе без ограничения антитубулиновые средства (например, паклитаксел, паклитаксел белок-связанные частицы для инъекционной суспензии, в том числе наб-паклитаксел, эрибулин, доцетаксел, иксабепилон, винкристин, ауристатины или майтанзиноиды), винорелбин, ДНК-алкилирующие средства (в том числе цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид), ДНК-интеркалирующие средства или

ингибиторы ДНК-топоизомеразы (в том числе антрациклины, такие как доксорубицин, пегилированный липосомальный доксорубицин, даунорубицин, идарубицин, митоксантрон или эпирубицин, камптотецины, такие как топотекан, иринотекан или эксатекан), 5-фторурацил, капецитабин, цитарабин, децитабин, 5-азацитадин, гемцитабин и метотрексат.

[000153] В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой ингибиторы киназы, включая без ограничения эрлотиниб, gefитиниб, нератиниб, афатиниб, осимертиниб, лапатаниб, кризотиниб, бригатиниб, церитиниб, алектиниб, лорлатиниб, эверолимус, темсиролимус, абемациклиб, LEE011, палбоциклиб, кабозантиниб, рипретениб, сунитиниб, пазопаниб, сорафениб, регорафениб, сунитиниб, акситиниб, дазатиниб, иматиниб, нилотиниб, идегалисиб, ибрутиниб, BLU-667, Лохо 292, ларотректиниб и квизартиниб.

[000154] В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой антиэстрогенные средства, включая без ограничения тамоксифен, фулвестрант, анастрозол, летрозол и эксеместан, антиандрогенные средства, включая без ограничения абиратерона ацетат, энзалутамид, нилутамид, бикалутамид, флутамид, ципротерона ацетат, стероидные средства, включая без ограничения преднизон и дексаметазон, ингибиторы PARP, включая без ограничения нерапариб, олапариб, талазопариб и рупапариб, ингибиторы топоизомеразы I, включая без ограничения иринотекан, камптотецин, эксатекан и топотекан, ингибиторы топоизомеразы II, включая без ограничения антрациклины, этопозид, этопозид фосфат и митоксантрон, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), включая без ограничения вориностат, ромидеписин, панобиностат, вальпроевую кислоту и белиностат, ингибиторы метилирования ДНК, включая без ограничения DZNep и 5-аза-2'-дезокситидин, ингибиторы протеасом, включая без ограничения бортезомиб и карфилзомиб, биологические средства, включая без ограничения трастузумаб, адотрастузумаб, пертузумаб, цетуксимаб и панитумумаб.

[000155] В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой антиангиогенные средства, включая бевацизумаб, афлиберцепт и AMG386.

[000156] В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), включая полезные нагрузки DM1, DM4, MMAE, MMAF или камптотецина, брентуксимаб ведотин и трастузумаб эмтанзин, лучевую терапию, терапевтические вакцины, включая без ограничения сипулейцел-Т.

[000157] В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство может представлять собой ингибитор аутофагии, включая ингибиторы ULK, ингибиторы VPS34, ингибиторы PIKfyve, ингибиторы PPT1 или лизосомальные блокаторы. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство может представлять собой DCC-3116, SAR405, SB02024, гидроксихлорохин, хлорохин, апилимод, MRT403 и LYS05.

[000158] В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из аналога гормона, стимулирующего высвобождение лютеинизирующего гормона (LHRH), включающего гозерелин и лейпролид.

[000159] В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из эверолимуса, трабектедина, абраксана, TLK 286, AV-299, DN-101, пазопаниба, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, энзастаурина, вандетаниба, ARQ-197, МК-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, пеметрекседа, эрлотиниба, дазатаниба, нилотиниба, декатаниба, панитумумаба, амрубицина, ореговомаба, Lep-etu, нолатрекседа, AZD 2171, батабулина, атумтунаба, занолимумаба, эдотекарина, тетрандрин, рубитекана, тесмилифена, облимерсена, тицилимумаба, ипилимумаба, госсипола, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, циленгитида, гиматекана, IL13-PE38QQR, INO 1001, IPdR<sub>1</sub> KRX-0402, луантона, LY 317615, нейрадиба, витеспана, Rta 744, аланозина (Sdx 102), талампанела, атрасентана, XR 311, ромидепсина, ADS-100380, сунитиниба, 5-фторурацила, вориностата, этопозид, гемцитабина, доксорубицина, иринотекана, липосомального доксорубицина, 5'-дезоксид-5-фторуридина, винкристина, темозоломида, ZK-304709, селициклиба; PD0325901, AZD-6244, капецитабина, L-глутаминовой кислоты, N-[4-[2-(2-амино-4,7-дигидро-4-оксо-1H-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-этил]бензоил]-, динатриевой соли, гептагидрата, камптотецина, PEG-меченного иринотекана, тамоксифена, торемифена цитрата, анастразола, эксместана, летрозолола, DES (диэтилстилбестолола), эстрадиола, эстрогена, конъюгированного эстрогена, бевацизумаба, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(метилсульфонилпиперадинметил)-индолил]-хинолона, ваталаниба, AG-013736, AVE-0005, ацетатной соли [D-Ser(tBu) 6, Azgly 10] (пиро-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub> ацетат [C<sub>59</sub>H<sub>84</sub>N<sub>18</sub>O<sub>14</sub>-(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, где x составляет от 1 до 2,4], гозерелина ацетата, лейпролида ацетата, трипторелина памоата, медроксипрогестерона ацетата, гидроксипрогестерона капроата, мегестрола ацетата, ралоксифена, бикалутамида, флутанида, нилутамида, мегестрола ацетата, CP-724714; TAK-165, HKI-272, эрлотиниба, лапатаниба, канертиниба, антитела ABX-EGF, эрбитукса, ЕКВ-569, PKI-166, GW-572016, ионафарниба, BMS-214662, типифарниба; амифостина, NVP-LAQ824, субероиланилидгидроксамовой кислоты, вальпроевой кислоты, трихостатина А, FK-228, SU11248, сорафениба, KRN951, аминоклутетимида, арнсакрина, анагрелида, L-аспарагиназы, вакцины бацилл Кальметта-Герена (BCG), блеомицина, бусерелина, бусульфана, карбоплатина, кармустина, хлорамбуцила, цисплатина, кладрибина, клодроната, ципротерона, цитарабина, дакарбазина, дактиномицина, даунорубицина, диэтилстилбестрола, эпирубицина, флударабина, флуорокортизона, флуоксиместерона, флутамида, гемцитабина, гливака, гидроксимочевины, идарубицина, ифосфамида, иматиниба, лейпролида, левамизола, ломустина, мехлоретамин, мелфалана, 6-меркаптопурина, месны, метотрексата, митомицина, митотана, митоксантрона, нилутамида, октреотида, оксалиплатина, памидроната, пентостатина, пликамицина, порфимера, прокарбазина, ралтитрекседа, ритуксимаба, стрептозоцина, тенипозид,

тестостерона, талидомида, тиогуанина, тиотепы, третиноина, виндезина, 13-цис-ретиноевой кислоты, мелфалана, урамустина, эстрамустина, алтретамина, флоксуридина, 5-дезоксидуридина, цитозин-арабинозида, 6-меркаптопурина, дезоксиформидина, кальцитриола, валрубицина, митрамицина, винбластин, винорелбина, топотекана, разоксина, маримастата, COL-3, неовастата, BMS-275291, скваламина, эндостатина, SU5416, SU6668, EMD121974, интерлейкина-12, IM862, ангиостатина, витаксина, дролоксифена, идоксифена, спиронолактона, финастерид, циметидина, трастузумаба, денилейкина дифтитокса, gefitinib, бортезомиба, иринотекана, топотекана, доксорубин, доцетаксел, винорелбин, бевацизумаба (моноклональное антитело) и эрбитукса, паклитаксел, не содержащего кремофор, эпитилона В, BMS-247550, BMS-310705, дролоксифена, 4-гидрокситамоксифена, пипендоксифена, ERA-923, арзоксифена, фулвестранта, аколбифена, лазофоксифена, идоксифена, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, рапамицина, 40-O-(2-гидроксиэтил)-рапамицина, темсиролимуса, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, вортманнина, ZM336372, L-779450, PEG-филграстима, дарбепоедина, эритропоедина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, золендроната, преднизона, цетуксимаба, гранулоцитарномикрофагального колониестимулирующего фактора, гистрелина, пегилированного интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2а, пегилированного интерферона альфа-2b, интерферона альфа-2b, азациитидина, PEG-L-аспарагиназы, леналидомида, гемтузумаба, гидрокортизона, интерлейкина-11, дексразоксана, алемтузумаба, полностью транс-ретиноевой кислоты, кетоконазола, интерлейкина-2, мегестрола, иммунного глобулина, азотистого иприта, метилпреднизолона, ибритгумомаба тиуксетана, андрогенов, децитабина, гексаметилмеламина, бексаротена, тоситумомаба, триоксида мышьяка, кортизона, эдитроната, митотана, циклоспорина, липосомального даунорубина, аспарагиназы Edwina, стронция 89, касопитанта, нетупитанта, антагониста рецептора NK-1, палоносетрона, апрепитанта, дифенилгидрамина, гидроксизина, метоклопрамида, лоразепам, алпразолам, галоперидол, дроперидол, дронабинол, дексаметазон, метилпреднизолона, прохлорперазина, гранисетрона, ондансетрона, доласетрона, трописетрона, пэгфилграстима, эритропоедина, эпоэтина альфа и дарбепоедина альфа, ипилимумаба и их смесей.

#### *Фармацевтические композиции и наборы*

[000160] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие соединения, которые описаны в данном документе, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие соединения, которые описаны в данном документе, составленные вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Такие составы включают составы, подходящие для перорального, ректального, местного, трансбуккального, парентерального (например, подкожного, внутримышечного, внутрикожного или

внутривенного), ректального, вагинального введения или введения с помощью аэрозоля, хотя наиболее подходящая форма введения в любом отдельном случае будет зависеть от степени и тяжести состояния, подвергающегося лечению, и от природы конкретного применяемого соединения. Например, раскрытые композиции могут быть составлены в виде однократной дозы и/или могут быть составлены для перорального или подкожного введения.

[000161] Иллюстративные фармацевтические композиции могут применяться в форме фармацевтических препаратов, например в твердой, полутвердой или жидкой форме, которые содержат одно или более соединений, описанных в данном документе, в качестве активного ингредиента, в смеси с органическим или неорганическим носителем или вспомогательным веществом, подходящим для внешних, энтеральных или парентеральных типов введения. Активный ингредиент может быть соединен, например, с обычными нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями для таблеток, пеллет, капсул, суппозиториев, растворов, эмульсий, суспензий и любых других форм, подходящих для применения. Активное соединение по настоящему изобретению включают в фармацевтическую композицию в количестве, достаточном для получения необходимого эффекта в отношении процесса или состояния заболевания.

[000162] Для изготовления твердых композиций, таких как таблетки, основной активный ингредиент может быть смешан с фармацевтическим носителем, например традиционными ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальция фосфат или виды камеди, и другими фармацевтическими разбавителями, например водой, с образованием твердой композиции до придания ей лекарственной формы, содержащей гомогенную смесь соединения, предусмотренного в данном документе, или его нетоксичную фармацевтически приемлемую соль. При упоминании таких композиций до придания им лекарственной формы как гомогенных, имеется в виду, что активный ингредиент равномерно диспергирован в композиции таким образом, что композиция может быть легко подразделена на равноэффективные стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы.

[000163] В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т. п.), основную композицию смешивают с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальция фосфат, и/или любым из следующего: (1) наполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или камедь; (3) увлажняющими средствами, такими как глицерин; (4) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгининовая кислота, некоторыми силикатами и карбонатом натрия; (5) средствами для замедления образования раствора, такими как парафин; (6) ускорителями впитывания,

такими как четвертичные соединения аммония; (7) смачивающими средствами, такими как, например, ацетиловый спирт и глицерина моностеарат; (8) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; (9) смазочными средствами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрия лаурилсульфат и их смеси; и (10) красящими средствами. В случае капсул, таблеток и пиллюль, композиции могут также содержать буферные средства. Твердые композиции подобного типа могут также использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с применением таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т. п.

[000164] Таблетка может быть сделана посредством прессования или формования, необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с применением связующего средства (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, натрия крахмалгликолята или поперечно-сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия), поверхностно-активного или диспергирующего средства. Таблетки, полученные путем формования, могут быть получены посредством формования с помощью подходящего оборудования смеси основной композиции, увлажненной с помощью инертного жидкого разбавителя. Таблетки и другие твердые лекарственные формы, такие как драже, капсулы, пиллюли и гранулы, необязательно могут иметь насечки или получены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, широко известные в области создания фармацевтических составов.

[000165] Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых, водных или органических растворителях или их смеси и порошки. Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и настойки. В дополнение к основной композиции жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, часто применяемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло зародышей семян, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, циклодекстринов и их смесей.

[000166] Суспензии в дополнение к основной композиции могут содержать суспендирующие средства, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовый сорбит и эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

[000167] Составы для ректального или вагинального введения могут быть

представлены в виде суппозитория, который может быть получен посредством смешивания основной композиции с одним или более подходящими не вызывающими раздражения вспомогательными веществами или носителями содержащими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для изготовления суппозитория или салицилат, и который является твердыми при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, следовательно, будет таять в полости тела и высвобождать активное средство.

[000168] Лекарственные формы для трансдермального введения основной композиции включают порошки, спреи, мази, пасты, крема, лосьоны, гели, растворы, патчи и формы для ингаляции. Активный компонент может быть смешан в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут быть необходимы.

[000169] Мази, пасты, крема и гели могут содержать в дополнение к основной композиции вспомогательные вещества, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

[000170] Порошки и спреи могут содержать в дополнение к основной композиции вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида или смеси таких веществ. Спреи могут дополнительно содержать общепринятые пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

[000171] Композиции и соединения по настоящему описанию могут в качестве альтернативы быть введены посредством аэрозоля. Это достигается посредством получения водного аэрозоля, препаратов на основе липосом или твердых частиц, содержащих соединение. Может применяться суспензия, основой которой не является вода (например, пропеллент на основе фторуглерода). Могут применяться ультразвуковые небулайзеры, поскольку они минимизируют повреждение средства напряжению сдвига, которое может привести к деградации соединений, содержащихся в основных композициях. Обычно водный аэрозоль производится посредством создания состава водного раствора или суспензии основной композиции вместе с традиционными фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы различаются согласно требованиям конкретной основной композиции, но как правило включают неионогенные поверхностно-активные вещества (твины, плуроники или полиэтиленгликоль), нетоксичные белки, такие как альбумин сыворотки крови, сложные эфиры сорбитана, олеиновую кислоту, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахароспирты. Аэрозоли обычно получают из изотонических растворов.

[000172] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для парентерального введения, содержат основную композицию в комбинации с одним или более фармацевтически-приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными

порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические факторы, растворы, которые делают состав изотоническим с кровью требуемого реципиента, или средства для суспендирования, или загустители.

[000173] Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, предусмотренных в данном документе, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат и циклодекстрины. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, с помощью применения материалов для нанесения покрытий, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с помощью применения поверхностно-активных веществ.

[000174] В другом варианте осуществления предусмотрены энтеральные фармацевтические составы, содержащие описанное соединение и энтеральный материал; и их фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Энтеральные материалы относятся к полимерам, которые являются в значительной степени нерастворимыми в кислой среде желудка, и которые являются преимущественно растворимыми в кишечном соке при конкретных значениях pH. Тонкая кишка представляет собой часть желудочно-кишечного тракта (кишечника) между желудком и толстой кишкой и включает двенадцатиперстную кишку, тощую кишку и подвздошную кишку. pH в двенадцатиперстной кишке составляет примерно 5,5, pH тощей кишки составляет примерно 6,5 и pH дистальной подвздошной кишки составляет примерно 7,5.

[000175] Соответственно, энтеральные материалы являются нерастворимыми, например, до достижения значения pH, составляющего примерно 5,0, примерно 5,2, примерно 5,4, примерно 5,6, примерно 5,8, примерно 6,0, примерно 6,2, примерно 6,4, примерно 6,6, примерно 6,8, примерно 7,0, примерно 7,2, примерно 7,4, примерно 7,6, примерно 7,8, примерно 8,0, примерно 8,2, примерно 8,4, примерно 8,6, примерно 8,8, примерно 9,0, примерно 9,2, примерно 9,4, примерно 9,6, примерно 9,8 или примерно 10,0. Иллюстративные энтеральные материалы включают ацетат-фталат целлюлозы (CAP), фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), фталат поливинилацетата (PVAP), ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCAS), ацетат-тримеллитат целлюлозы, сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетилцеллюлозы, ацетат-гексагидрофталат целлюлозы, пропионат-фталат целлюлозы, ацетат-малеат целлюлозы, ацетат-бутират целлюлозы, ацетат-пропионат целлюлозы, сополимер метилметакриловой кислоты и метилметакрилата, сополимер метилакрилата, метилметакрилата и метакриловой кислоты, сополимер метилвинилового эфира и малеинового ангидрида (серии Gantrez ES), сополимер этилметилакрилат-

метилметакрилат-хлортриметиламмония этилакрилата, природные смолы, такие как зеин, шеллак и копал коллофоры, а также некоторые коммерчески доступные энтеральные дисперсионные системы (например, Eudragit L30D55, Eudragit FS30D, Eudragit L100, Eudragit S100, Kollicoat EMM30D, Estacryl 30D, Coateric и Aquateric). Растворимость каждого из вышеперечисленных материалов либо широко известна, либо может быть без труда определена *in vitro*. Вышеуказанный список представляет собой список возможных материалов, но специалисту в данной области с помощью данного описания будет очевидно, что оно не является исчерпывающим, и что существуют другие энтеральные материалы, которые будут соответствовать целям, описанным в данном документе.

[000176] Преимущественно в данном документе предусмотрены наборы для применения, например потребителем, нуждающимся в лечении рака. Такие наборы включают подходящие лекарственные формы, такие как формы, описанные выше, и инструкции, описывающие способ с применением такой лекарственной формы для опосредования, уменьшения или предупреждения воспаления. В инструкции будет указано потребителю или медицинскому персоналу, как вводить лекарственную форму в соответствии со способами введения, известными специалистам в данной области. Такие наборы могут преимущественно быть упакованы и реализованы в единицах, состоящих из одной или нескольких единиц в наборе. Примером такого набора является так называемая блистерная упаковка. Блистерные упаковки широко известны в упаковочной промышленности и являются широко применяемыми для упаковки фармацевтических стандартных лекарственных форм (таблетки, капсулы и т. п.). Блистерные упаковки обычно состоят из листа относительно твердого материала, покрытого пленкой из предпочтительно прозрачного пластикового материала. Во время процесса упаковки в пластиковой пленке формируют углубления. Углубления имеют размер и форму таблеток или капсул, подлежащих упаковке. Далее, таблетки или капсулы помещают в углубления и лист относительно твердого материала запечатывают относительно пластиковой пленки со стороны пленки, которая является противоположной от направления, в котором формировали углубления. В результате, таблетки или капсулы упакованы в углублениях между пластиковой пленкой и листом. Предпочтительно, плотность листа является такой, чтобы таблетки или капсулы могли быть удалены из блистерной упаковки посредством надавливания руками на углубления, посредством чего в листе образуется вскрытие в месте углубления. Таблетка или капсула может затем быть удалена посредством указанного вскрытия.

[000177] Может быть необходимым предоставить памятку в наборе, например, в виде чисел возле таблеток или капсул, где числа соответствуют дням режима, в которые указанные таблетки или капсулы должны быть приняты внутрь. Другим примером такой памятки является календарь, напечатанный на картоне, например, следующим образом: «первая неделя, понедельник, вторник, . . . и т. д. . . . вторая неделя, понедельник, вторник, . . . » и т. д. Другие вариации памяток будут очевидны. «Суточная доза» может представлять собой отдельную таблетку или капсулу или несколько пилюль или капсул,

подлежащих приему в отдельно взятый день. Также суточная доза первого соединения может состоять из одной таблетки или капсулы, в то время как суточная доза второго соединения может состоять из нескольких таблеток или капсул, и наоборот. Это должно быть отражено в памятке.

### ПРИМЕРЫ

[000178] Соединения, описанные в данном документе, могут быть получены множеством путей, на основании идей, содержащихся в данном документе, и описаний способов синтеза, известных из уровня техники. В описании способов синтеза, описанных ниже, следует понимать, что все предложенные условия реакций, включая выбор растворителя, атмосферу реакции, температуру реакции, продолжительность эксперимента и процедур обработки, могут быть выбраны в качестве стандартных условий для данной реакции, если не указано иное. Специалисту в области техники органического синтеза известно, что функциональные группы, присутствующие на различных частях молекулы, должны быть совместимыми с предложенными реагентами и реакциями. Заместители, несовместимые с условиями реакции, будут очевидны для специалиста в данной области техники, и поэтому указаны альтернативные способы. Исходные материалы для данных примеров являются либо коммерчески доступными, либо их легко получить посредством стандартных способов из известных материалов.

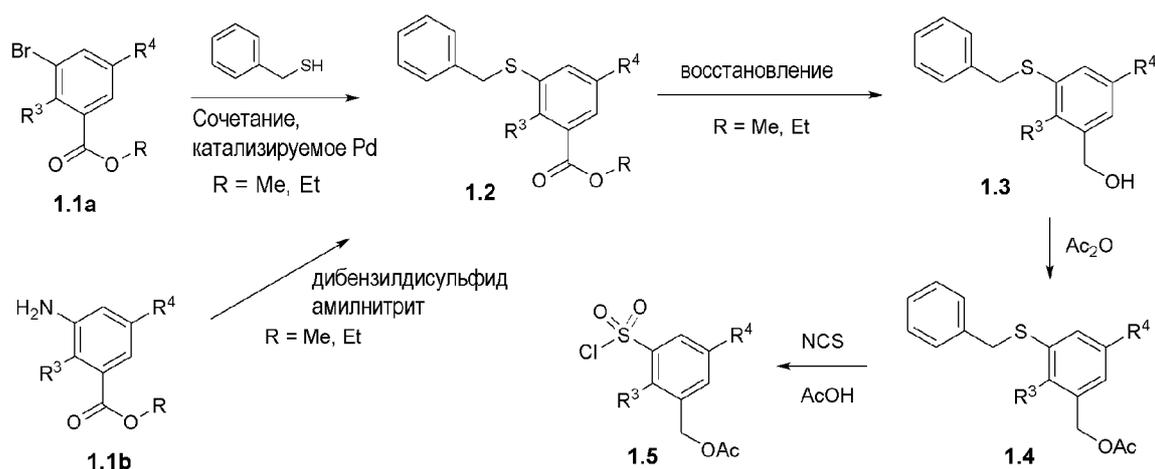
[000179] В настоящем изобретении используются следующие аббревиатуры, и они имеют следующие определения. «AcOH» означает уксусную кислоту, «АДФ» означает аденозиндифосфат, «Ar» означает газообразный аргон, «ASNaза» означает аспарагиназу, «Boc» означает *трет*-бутилкарбонат, «конц.» означает концентрированный, «Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>» означает карбонат цезия, «ДХМ» означает дихлорметан, «DIAD» означает диизопропилазодикарбоксилат, «DIEA» означает *N,N*-диизопропилэтиламин, «ДМФА» означает *N,N*-диметилформамид, «dppf» означает 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен, «ДМСО» означает диметилсульфоксид, «ЭДТК» означает этилендиаминтетрауксусную кислоту, «ИЭР» означает ионизацию электрораспылением, «EtOAc» означает этилацетат, «EtOH» означает этанол, «GST» означает глутатион-*S*-трансферазу, «ч» означает час или часы, «HCl» означает хлористоводородную кислоту, «Hex» означает гексан, «H<sub>2</sub>O» означает воду, «IC<sub>50</sub>» означает полумаксимальную ингибирующую концентрацию, «K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>» означает карбонат калия, «KOAc» означает ацетат калия, «NaBH<sub>4</sub>» означает боргидрид натрия, «LAN» означает алюмогидрид лития, «CH<sub>3</sub>CN» означает ацетонитрил, «*m*CPBA» означает 4-хлорпербензойную кислоту, «MeOH» означает метанол, «МГц» означает мегагерц, «мин» означает минуту или минуты, «МС» означает масс-спектрометрию, «NADH» означает никотинамид-аденин-динуклеотид, «NaH» означает гидрид натрия, «NaHCO<sub>3</sub>» означает бикарбонат натрия, «NaNO<sub>2</sub>» означает нитрит натрия, «NaOMe» означает метоксид натрия, «Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>» означает сульфат натрия, «NBS» означает *N*-бромсукцинимид, «NCS» означает *N*-хлорсукцинимид, «NH<sub>4</sub>Cl» означает хлорид аммония, «NIS» означает *N*-йодсукцинимид, «ЯМР» означает ядерный магнитный резонанс, «PBS» означает фосфатно-солевой буфер, «Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>» означает

трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0), «Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>» означает дихлорид 1,1-бис(дифенилфосфино)ферроценпалладия (II), «Ph<sub>3</sub>P» означает трифенилфосфин, «PMB» означает *para*-метоксibenзил, «POCl<sub>3</sub>» означает оксихлорид фосфора, «к. т.» означает комнатную температуру, которая также известна как «температура окружающей среды», которую следует понимать как состоящую из диапазона нормальных лабораторных температур в от 15 до 25 °С, «насыщенный» означает насыщенный, «SDS» означает додецилсульфат натрия, «SOCl<sub>2</sub>» означает тионилхлорид, «ТЭА» означает триэтиламин, «ТФК» означает трифторуксусную кислоту, «ТГФ» означает тетрагидрофуран, и «Xantphos» означает 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен.

### Общая химия

[000180] Иллюстративные соединения, описанные в данном документе, являются доступными посредством общих способов синтеза, проиллюстрированных на схемах ниже, посредством путей получения промежуточных соединений и в сопутствующих примерах.

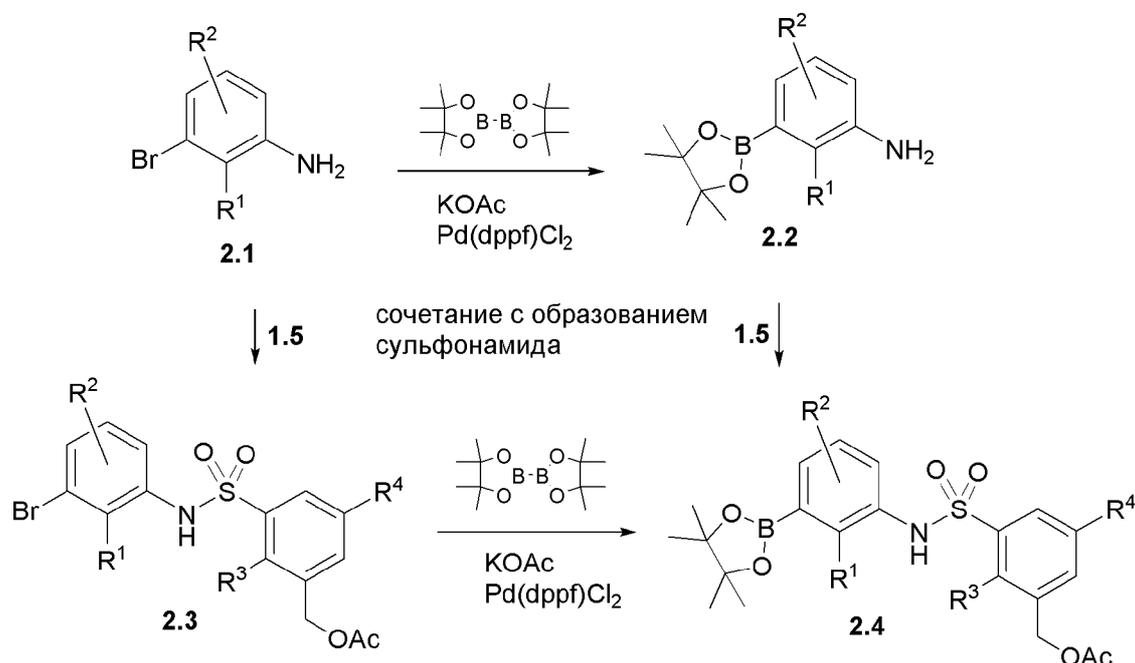
#### Схема 1



[000181] На схеме 1 проиллюстрирован пример получения сульфонилхлоридов **1.5**. Бромиды **1.1a** (коммерчески доступные или синтезированные специалистами в данной области техники) превращают в тиоэфиры **1.2** посредством реакции сочетания, катализируемой Pd (например, с применением Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, XantPhos, фенилметантиола в присутствии основания, такого как DIEA, в растворителе, таком как толуол, и при повышенной температуре). В качестве альтернативы соединения **1.2** могут быть получены из анилинов **1.1b** (коммерчески доступных или синтезированных специалистами в данной области техники) путем диазотирования с применением дибензилдисульфида и амилнитрита в CH<sub>3</sub>CN при повышенной температуре. В результате восстановления сложных эфиров **1.2** (R=Me, Et) с помощью восстанавливающих агентов (ЛАН или NaBH<sub>4</sub>) получают первичные спирты **1.3**. Спирт **1.3** может быть преобразован в **1.4** путем реакции с уксусным ангидридом в присутствии основания, такого как DIEA. Наконец, с помощью мягкого окисления тиоэфиров **1.4** комбинацией NCS и AcOH получают

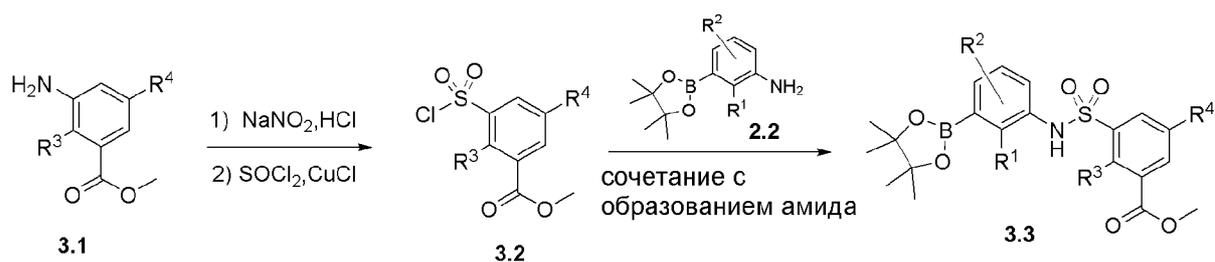
соответствующие сульфонилхлориды **1.5** в соответствии с общими условиями реакции, описанными в *Synthesis*, 2006, 24, 4131-4134, и *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 3447-3460.

### Схема 2



[000182] На схеме 2 проиллюстрирован пример получения боронатов **2.4**. Соединения **2.1** (коммерчески доступные, синтезированные, как описано в WO2013134298, или синтезированные специалистами в данной области техники) приводят во взаимодействие с бис(пинаколато)дибором посредством реакции борилирования, известной специалистам в данной области техники (палладий-опосредованной реакции, проводимой с применением палладиевых катализаторов, таких как Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, подходящего основания, такого как KOAc, в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, при повышенной температуре) с получением соединений **2.2**, которые приводят во взаимодействие с сульфонилхлоридами **1.5** (см. схему 1) с получением соединений **2.4**. В качестве альтернативы соединения **2.1** приводят во взаимодействие с сульфонилхлоридами **1.5** с получением сульфонамидов **2.3**, которые превращают в боронаты **2.4** в условиях реакции борилирования, известных специалистам в данной области техники.

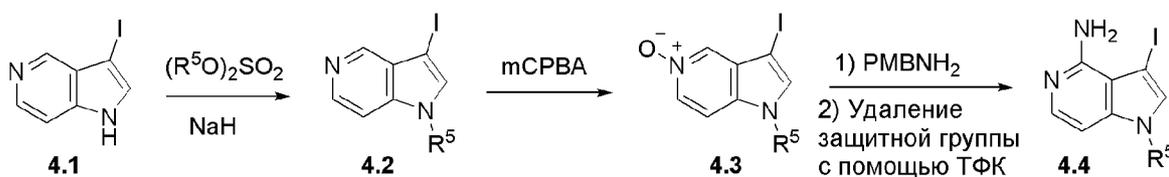
### Схема 3



[000183] На схеме 3 проиллюстрирован пример получения боронатов **3.3**.

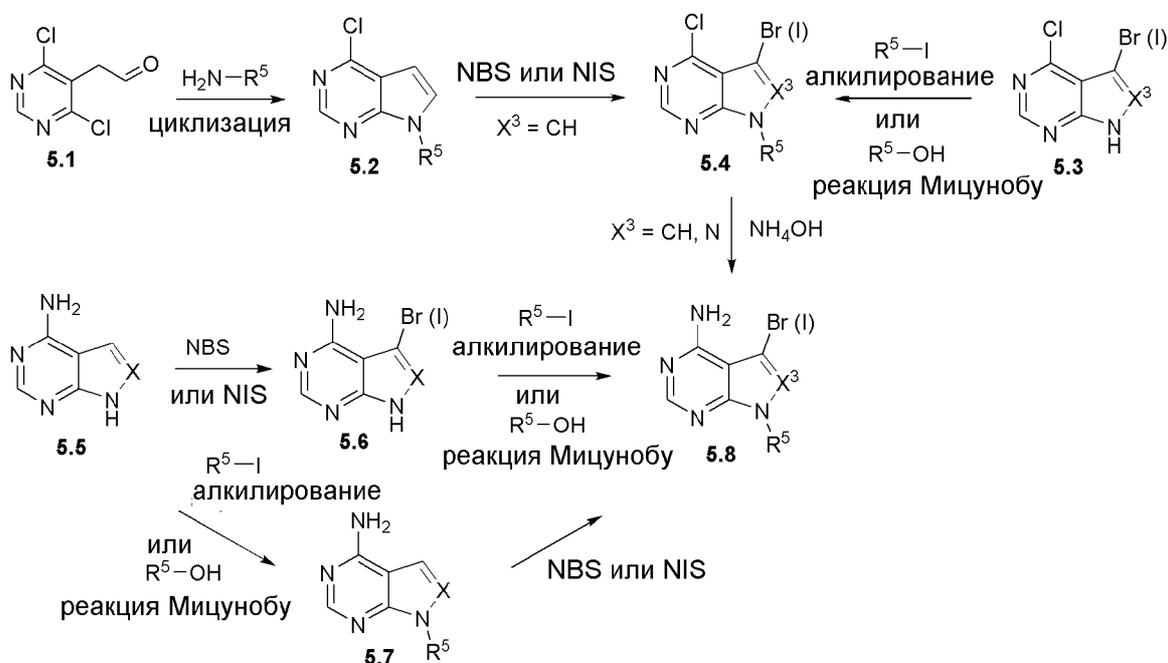
Соединения **3.2** могут быть получены из анилинов **3.1** (коммерчески доступных или синтезированных специалистами в данной области техники) путем диазотирования с последующим Cu-опосредованным хлорированием полученного промежуточного соединения (в соответствии с общими условиями реакции, описанными в *Org. Proc. Res. Dev.*, 2009, 5, 875-879). Сульфонилхлориды **3.2** приводят во взаимодействие с аминами **2.2** в условиях сочетания для получения сульфонамидов с получением сульфонамидов **3.3**.

Схема 4



[000184] На схеме 4 проиллюстрирован пример получения промежуточных соединений **4.4**. N-алкилирование 3-йод-1H-пирроло[3,2-с]пиридина **4.1** алкилирующим реагентом  $(R^5O)_2SO_2$  в присутствии основания, такого как NaH, приводит к получению **4.2**. Соединения **4.2** можно активировать путем окисления, известного из уровня техники, такого как окисление с применением mCPBA в ДХМ, с получением N-оксидов **4.3**. Пирролопиридин-N-оксиды **4.3** преобразуют в аминопирролопиридины **4.4** с применением смеси PMBNH<sub>2</sub> и п-толуолсульфонилхлорида с последующим удалением защитной группы in situ с помощью ТФК.

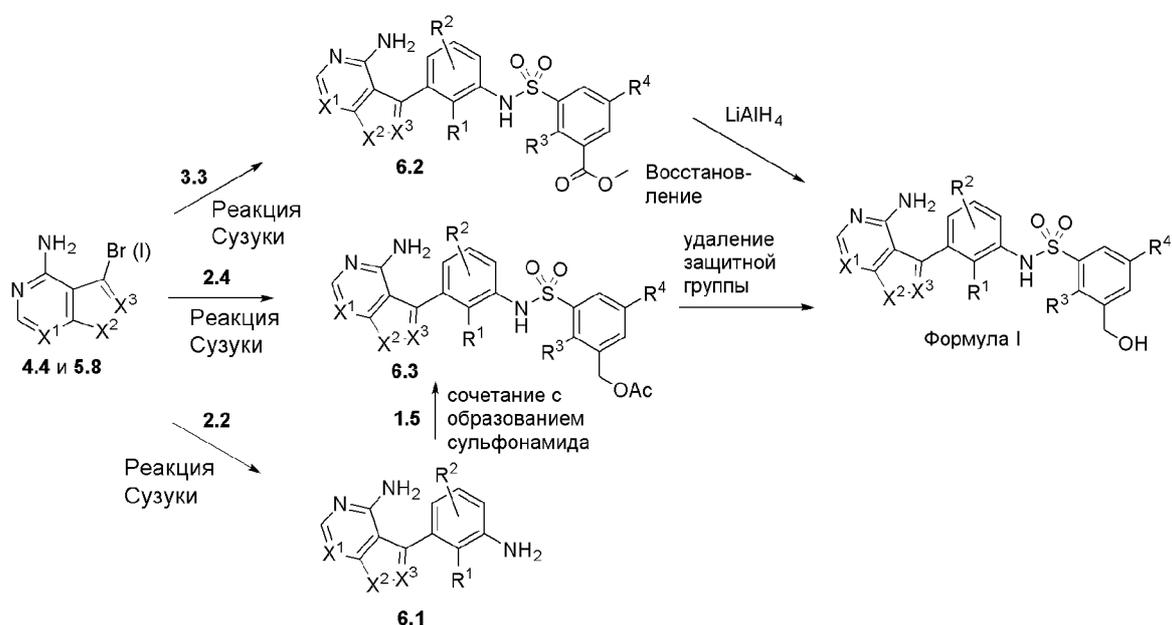
Схема 5



[000185] На схеме 5 проиллюстрирован пример получения промежуточных соединений **5.8**. Циклизация 2-(4,6-дихлорпиримидин-5-ил)ацетальдегида **5.1** различными аминами ( $R^5-NH_2$ ) в присутствии основания, такого как ТЭА, в протонном растворителе, таком как EtOH, при повышенной температуре приводит к получению соединений **5.2**.

Бромирование (или йодирование) **5.2** с помощью NBS (или NIS) приводит к получению соединений **5.4** ( $X=CH$ ). Соединения **5.5** приводят во взаимодействие с NBS (или NIS) с получением **5.6**. Алкилирование соединений **5.3**, **5.5** и **5.6** алкилирующими реагентами ( $R^5-I$ ) приводит к получению **5.4**, **5.7** и **5.8**, соответственно. В качестве альтернативы соединения **5.3**, **5.5** и **5.6** приводят во взаимодействие со спиртами ( $R^5-OH$ ) в стандартных условиях реакции Мицунобу (проводимой, например, в присутствии  $Ph_3P$  и DIAD) с получением **5.4**, **5.7** и **5.8**, соответственно. В другом варианте осуществления промежуточные соединения **5.8** также могут быть получены из **5.4** посредством реакции замещения с гидроксидом аммония и из **5.7** посредством бромирования (или йодирования) с NBS (или NIS).

Схема 6



[000186] На схеме 6 проиллюстрирован пример получения соединения **формулы I**. Бромиды (или йодиды) **4.4** и **5.8** приводят во взаимодействие с боронатами **2.2** в присутствии палладиевого катализатора (условия реакции Сузуки) с получением анилинов **6.1**. С помощью реакции сочетания для получения сульфонамидов, которую проводят между анилинами **6.1** и сульфонилхлоридами **1.5**, получают сульфонамиды **6.3**. В качестве альтернативы, **6.3** можно получить из бромидов (или йодидов) **4.4** и **5.8** с боронатами **2.4** в условиях реакции Сузуки. Удаление защитной группы сульфонамидов **6.3** с помощью  $K_2CO_3$  в протонном растворителе, таком как MeOH, при к. т. приводит к получению соединения **формулы I**. В другом варианте осуществления бромиды (или йодиды) **4.4** и **5.8** приводят во взаимодействие с боронатами **3.3** в присутствии палладиевого катализатора (условия реакции Сузуки) с получением **6.2**. Восстановление **6.2** в  $LiAlH_4$  приводит к получению первичных спиртов **формулы I**.

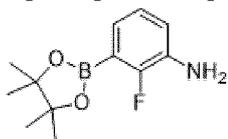
#### Получение промежуточных соединений и конечных соединений.

[000187] С применением процедур и способов синтеза, описанных в данном

документе, и способов, известных специалистам в данной области техники, были получены следующие соединения.

**Общий способ А:** борилирование

Пример А1: 2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)анилин

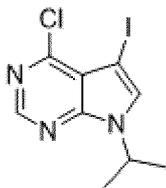


[000188] Смесь КОАс (4,6 г, 47,4 ммоль), 3-бром-2-фторанилина (3,0 г, 15,8 ммоль) и 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (4,8 г, 18,9 ммоль) в 1,4-диоксане (30 мл) дегазировали с помощью Ag в течение 10 мин. Добавляли аддукт PdCl<sub>2</sub>(dppf) ДХМ (1,3 г, 1,6 ммоль) и нагревали реакционную смесь при 110 °С в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до к. т. и фильтровали через слой целита. Фильтрат удаляли при пониженном давлении и очищали остаток посредством колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 50% EtOAc/гексаны) с получением 2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)анилина (2,7 г, 72%) в виде бежевого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 6,86 (м, 2H), 6,76 (д, J=6,8 Гц, 1H), 5,02 (с, 2H), 1,28 (с, 12H); МС (ИЭР) m/z: 238,2 (M+H<sup>+</sup>).

[000189] С применением вышеприведенного общего способа А получали следующие промежуточные соединения из таблицы А.

**Таблица А.**

№ прим.	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ	МС (m/z: M+H <sup>+</sup> )
A2		88	6,77 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,42 (м, 2H), 5,42 (с, 2H), 1,27 (с, 12H).	238,2
A3		неочищенный	Данные отсутствуют	256,2
A4		36	6,59 (м, 2H), 5,20 (шс, 2H), 1,28 (с, 12H).	256,1
A5		43	6,99 (т, J=7,6 Гц, 1H), 6,86 (д, J=6,4 Гц, 1H), 6,77 (д, J=6,8 Гц, 1H), 5,25 (шс, 2H), 1,28 (с, 12H).	254,1

**Общий способ В:** алкилированиеПример **В1:** 4-хлор-5-йод-7-изопропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин

[000190] Раствор 4-хлор-5-йод-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидина (2,0 г, 7,2 ммоль) в ДМФА (18 мл) обрабатывали  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (4,7 г, 14 ммоль). Добавляли 2-йодпропан (1,2 г, 7,2 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при к. т. в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в воду (100 мл) и собирали твердые вещества посредством вакуумной фильтрации с получением 4-хлор-5-йод-7-изопропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидина (1,8 г, 78%) в виде желтого рыхлого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  8,63 (с, 1H), 8,18 (д,  $J=1,4$  Гц, 1H), 5,04 (м, 1H), 1,47 (д,  $J=6,8$  Гц, 6H); МС (ИЭР)  $m/z$ : 322,0 ( $M+H^+$ ).

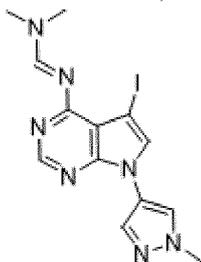
С применением вышеприведенного общего способа В получали следующие промежуточные соединения в таблице В.

**Таблица В.**

№ при м.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	$^1\text{H}$ ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): $\delta$	МС ( $m/z$ : $M+H^+$ )
В2			68	8,64 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 3,82 (с, 3H).	294,01
В3			74	8,64 (д, $J=1,6$ Гц, 1H), 7,99 (т, $J=1,5$ Гц, 1H), 4,43 (т, $J=5,3$ Гц, 2H), 3,71 (т, $J=5,3$ Гц, 2H), 3,22 (с, 3H).	338,0
В4			неочищенные	8,65 (с, 1H), 7,98 (с, 1H).	Данные отсутствуют
В5			74	8,81 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 1,61 (с, 9H).	379,8

Получение **В6:** (E)-N'-(5-йод-7-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-7Н-пирроло[2,3-

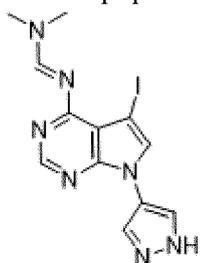
d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаид



[000191] Раствор 5-йод-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амина (5,0 г, 19 ммоль) в ДМФА (50 мл) обрабатывали димилацеталем N,N-диметилформаида (3,43 г, 28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и разбавляли остаток ДХМ (150 мл), промывали насыщенным солевым раствором (2х). Органический слой высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Растирали неочищенное вещество с диэтиловым эфиром (100 мл) и отфильтровывали твердые вещества с получением требуемого (Е)-N'-(5-йод-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаида (5,0 г, 85%). <sup>1</sup>Н ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 11,9 (с, 1Н), 8,80 (с, 1Н), 8,27 (с, 1Н), 7,41 (д, J=2,0, 1Н), 3,21 (с, 3Н), 3,17 (с, 3Н); МС (ИЭР) m/z: 315,8 (М+Н<sup>+</sup>).

[000192] Раствор (Е)-N'-(5-йод-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаида (2,0 г, 6,3 ммоль) и 1-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразола (1,6 г, 7,6 моль) в ДМФА (30 мл) в атмосфере кислорода обрабатывали NaHCO<sub>3</sub> (1,3 г, 12,6 ммоль), 2,2-бипиридилем (1,1 г, 6,9 ммоль) и Cu(OAc)<sub>2</sub> (1,3 г, 6,9 моль) при к. т. Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 4 дней и концентрировали при пониженном давлении. Растирали неочищенное вещество с диэтиловым эфиром (60 мл) и отфильтровывали твердые вещества с получением требуемого (Е)-N'-(5-йод-7-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаида (3,0 г, неочищенный), который использовали для следующей реакции без дополнительной очистки. МС (ИЭР) m/z: 395,8 (М+Н<sup>+</sup>).

Пример В7: (Е)-N'-(5-йод-7-(1Н-пиразол-4-ил)-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаид

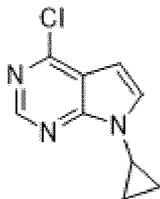


[000193] (Е)-N'-(5-Йод-7-(1Н-пиразол-4-ил)-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаид получали так же, как пример В6, из (Е)-N'-(5-йод-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-N,N-диметилформимидаида (0,69 г, 2,2 ммоль) и 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразола (0,5 г, 2,6 моль). МС (ИЭР)

m/z: 381,8 (M+H<sup>+</sup>).

**Общий способ С:** циклизация

Пример С1: 4-хлор-7-циклопропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин

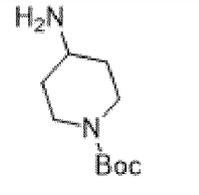
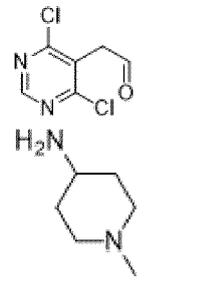
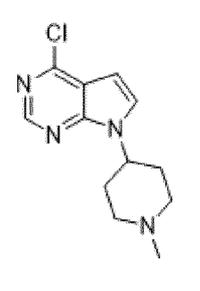


[000194] Раствор 2-(4,6-дихлорпиримидин-5-ил)ацетальдегида (2,0 г, 10,5 ммоль) в EtOH (18 мл) обрабатывали Et<sub>3</sub>N (2,9 мл, 21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 10 мин и затем добавляли циклопропанамин (0,6 мл, 9,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 140 °С в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до к. т. и затем концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 100% EtOAc/гексаны) с получением 4-хлор-7-циклопропил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидина (1,6 г, 79%) в виде светло-желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,59 (с, 1H), 7,65 (д, J=3,7 Гц, 1H), 6,54 (д, J=3,5 Гц, 1H), 3,59 (м, 1H), 1,01-1,03 (м, 4H); МС (ИЭР) m/z: 194,0 (M+H<sup>+</sup>).

С применением вышеприведенного общего способа С получали следующие промежуточные соединения из таблицы С.

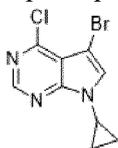
**Таблица С.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ	МС (m/z: M+H <sup>+</sup> )
C2			73	8,67 (с, 1H), 8,18 (д, J=3,7 Гц, 1H), 6,78 (д, J=3,7 Гц, 1H), 5,98 (м, 1H), 5,02 (дд, J=7,2, 1,6 Гц, 4H).	210,0
C3			38	Данные отсутствуют	309,2
C4			74	Данные отсутствуют	337,2

					
C5			91	8,66 (с, 1H), 7,84 (д, J=3,7 Гц, 1H), 6,72 (д, J=3,7 Гц, 1H), 4,88 (м, 1H), 3,34 (м, 2H), 2,94 (шм, 2H), 2,64 (с, 3H), 2,40 (м, 2H), 2,10 (м, 2H).	251,0

**Общий способ D:** бромирование или йодирование

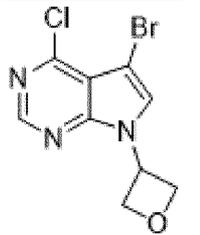
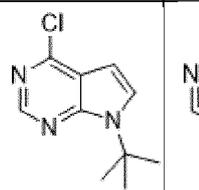
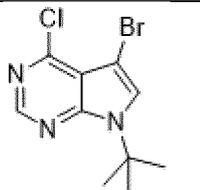
Пример **D1:** 5-бром-4-хлор-7-циклопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин

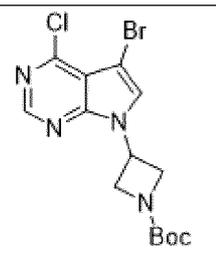
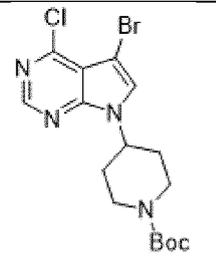
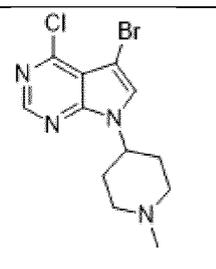


[000195] Раствор 4-хлор-7-циклопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидина (**C1**, 0,67 г, 3,5 ммоль) в ДХМ (15 мл) обрабатывали NBS (0,74 г, 4,2 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 1 ч. при к. т. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и суспендировали остаток в воде (5 мл). Твердые вещества отфильтровывали и промывали водой (2 мл), высушивали под вакуумом с получением 5-бром-4-хлор-7-циклопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидина (0,6 г, 64%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,69 (с, 1H), 8,00 (д, J=2,1 Гц, 1H), 3,66 (м, 1H), 1,10 (м, 4H); МС (ИЭР) m/z: 272,0 (M+H<sup>+</sup>) и 274.

С применением вышеприведенного общего способа D получали следующие промежуточные соединения в таблице D.

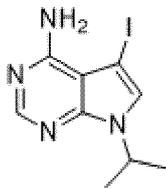
**Таблица D.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ	МС (m/z: M+H <sup>+</sup> )
D2	C2		86	8,70 (с, 1H), 8,46 (с, 1H), 5,95 (м, 1H), 4,90-5,11 (м, 4H).	288,0 290,0
D3			65	Данные отсутствуют	288,0 290,0

D4	C3		87	8,68 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 5,58 (м, 1H), 4,33 (м, 4H), 1,43 (с, 9H).	387,0 389,0
D5	C4		93	8,67 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 4,90 (м, 1H), 4,12 (шм, 2H), 2,95 (шм, 2H), 1,85-2,10 (м, 4H), 1,44 (с, 9H).	415,0 417,0
D6	C5		76	Данные отсутствуют	329,0 331,0

**Общий способ E:** замещение

Пример **E1:** 5-йод-7-изопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амин

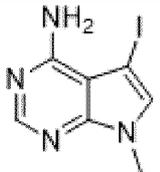
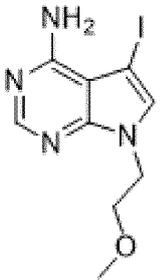
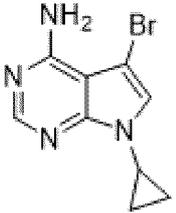
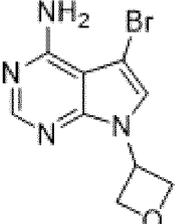
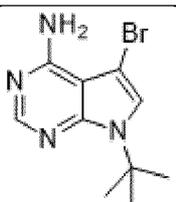
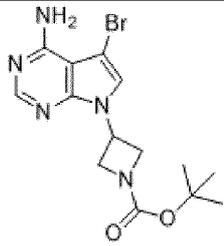
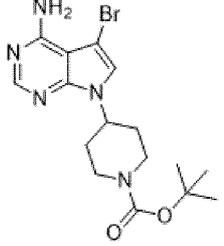


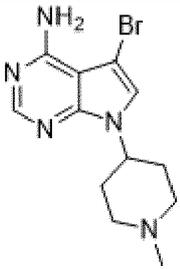
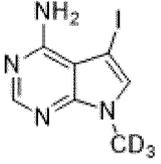
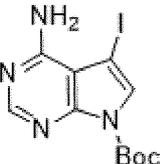
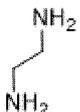
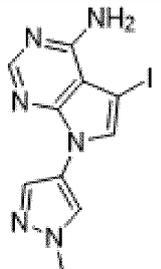
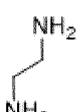
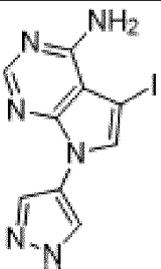
[000196] Суспензию 4-хлор-5-йод-7-изопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидина (**B1**, 1,78 г, 5,5 ммоль) в 1,4-диоксане (5,5 мл) обрабатывали  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30% в воде, 1,7 мл, 13 ммоль) и нагревали реакционную смесь до  $95^\circ\text{C}$  в течение ночи. Смесь охлаждали до к. т. и разбавляли холодной водой. Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, а затем собирали твердые вещества посредством вакуумной фильтрации с получением требуемого продукта, 5-йод-7-изопропил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амина (0,80 г, 48%), в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  8,09 (с, 1H), 7,59 (с, 1H), 6,59 (с, 2H), 4,89 (м, 1H), 1,40 (д,  $J=6,8$  Гц, 6H); МС (ИЭР)  $m/z$ : 303,0 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

С применением вышеприведенного общего способа E получали следующие промежуточные соединения из таблицы E.

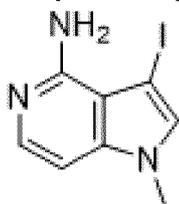
**Таблица E.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	$^1\text{H}$ ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): $\delta$	МС ( $m/z$ : $\text{M}+\text{H}^+$ )
---------	---------------	---------	-----------	--	--------------------------------------

E2	B2		56	8,09 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 6,57 (шс, 2H), 3,66 (с, 3H).	274,78
E3	B3		71	8,10 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 6,61 (с, 2H), 4,26 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,64 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,22 (с, 3H).	319,0
E4	D1		97	8,17 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 6,78 (с, 2H), 3,56 (м, 1H), 1,05 (д, J=6,7 Гц, 4H).	253,0 255,0
E5	D2		62	Данные отсутствуют	269,0 271,0
E6	D3		71	Данные отсутствуют	269,0 271,0
E7	D4		80	8,10 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 6,70 (шс, 2H), 5,43 (м, 1H), 4,16-4,38 (м, 4H), 1,42 (с, 9H).	368,2 370,2
E8	D5		87	8,10 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 6,72 (шс, 2H), 4,68 (м, 1H), 4,10 (шм, 2H), 2,91 (шм, 2H), 1,70-1,99 (м, 4H), 1,43 (с, 9H).	396,2 398,2

E9	D6		42	8,02 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 6,63 (с, 2H), 4,40 (м, 1H), 2,81 (м, 2H), 2,14 (с, 3H), 1,89-2,01 (м, 4H), 1,65-1,82 (м, 2H).	310,0 312,0
E10	B4		90	8,10 (с, 1H), 7,40 (с, 1H), 6,62 (шс, 2H).	278,0
E11	B5		58	8,23 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 6,86 (шс, 2H), 1,60 (с, 9H).	360,8
E13	B6 		23	8,32 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 6,74 (шс, 2H), 3,89 (с, 3H).	340,8
E14	B7 		10	11,41 (шс, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,04 (дд, J=3,2, 2,4 Гц, 1H), 6,84 (шм, 3H), 7,04 (дд, J=3,6, 2,0 Гц, 1H).	326,8

Получение примера **E12**: 3-йод-1-метил-1H-пирроло[3,2-с]пиридин-4-амин



[000197] Перемешиваемую суспензию 3-йод-1-метил-1H-пирроло[3,2-с]пиридина (0,90 г, 3,5 ммоль) в ДХМ (20 мл) обрабатывали 3-хлорпероксибензойной кислотой (0,90 г, 5,2 ммоль) при к. т. Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и затем экстрагировали ДХМ (2х). Объединенные органические слои высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного 3-йод-1-

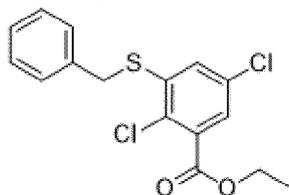
метил-1Н-пирроло[3,2-с]пиридин-5-оксида (0,6 г, 65%) в виде грязновато-белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  8,12 (с, 1Н), 8,00 (д,  $J=7,2$  Гц, 1Н), 7,34 (с, 1Н), 7,59 (д,  $J=7,2$  Гц, 1Н), 3,82 (с, 3Н); МС (ИЭР)  $m/z$ : 275,0 ( $M+H^+$ ).

[000198] Раствор 3-йод-1-метил-1Н-пирроло[3,2-с]пиридин-5-оксида (0,6 г, 2,1 ммоль) в хлороформе (20 мл) обрабатывали (4-метоксифенил)метанамином (1,3 г, 9,8 ммоль) и перемешивали в течение примерно 30 мин при к. т. Смесь охлаждали до 0 °С, затем по частям добавляли *n*-толуолсульфонилхлорид (0,92 г, 4,8 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при к. т. в течение 2,5 ч. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщ. раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Отделяли органический слой, высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (70% EtOAc/гексаны) с получением 3-йод-N-(4-метоксибензил)-1-метил-1Н-пирроло[3,2-с]пиридин-4-амина (0,2 г, 23%) в виде бледно-желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  7,68 (д,  $J=6,4$  Гц, 1Н), 7,36 (с, 1Н), 7,31 (д,  $J=7,6$  Гц, 2Н), 6,89 (д,  $J=7,6$  Гц, 2Н), 6,81 (д,  $J=6,0$  Гц, 1Н), 6,14 (шм, 1Н), 4,64 (д,  $J=5,2$  Гц, 2Н), 3,73 (с, 3Н), 3,69 (с, 3Н); МС (ИЭР)  $m/z$ : 394,2( $M+H^+$ ).

[000199] Суспензию 3-йод-N-(4-метоксибензил)-1-метил-1Н-пирроло[3,2-с]пиридин-4-амина (0,2 г, 0,508 ммоль) в ДХМ (10 мл) перемешивали на бане со льдом и водой. По каплям добавляли ТФК (1 мл) и затем перемешивали реакционную смесь при к. т. в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и обрабатывали остаток насыщ. раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Перемешивали смесь в течение 10 мин и дополнительно экстрагировали водный слой 10% смесью MeOH/ДХМ (2х). Объединенные органические экстракты высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 3 до 5% MeOH/ДХМ) с получением 3-йод-1-метил-1Н-пирроло[3,2-с]пиридин-4-амина (0,05 г, 36%) в виде грязновато-белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  7,63, (д,  $J=6,4$  Гц, 1Н), 7,48 (с, 1Н), 6,94 (д,  $J=6,4$  Гц, 1Н), 6,35 (шс, 2Н), 3,72 (с, 3Н); МС (ИЭР)  $m/z$ : 273,9( $M+H^+$ ).

**Общий способ F:** получение тиоэфиров из аминов

Пример F1: этил-3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензоат

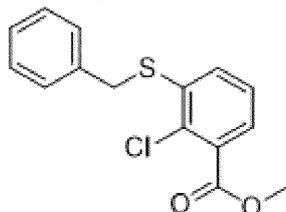


[000200] Раствор этил-3-амино-2,5-дихлорбензоата (12,0 г, 51,0 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (250 мл) обрабатывали амилнитритом (9,64 мл, 81,0 ммоль). Добавляли дибензилдисульфид (12,6 г, 51,0 ммоль) при к. т. и реакционную смесь нагревали при 70 °С в течение 3 ч. Реакционную смесь гасили ледяной водой (100 мл) и экстрагировали

EtOAc (3x). Объединенные органические слои высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (от 10 до 20% EtOAc/гексаны) с получением этил-3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензоата (10,0 г, 58%) в виде грязновато-белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  7,63 (д,  $J=2,8$  Гц, 1H), 7,56 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 7,44 (д,  $J=7,2$  Гц, 2H), 7,35 (т,  $J=7,6$  Гц, 2H), 7,28 (д,  $J=7,2$  Гц, 1H), 4,42 (с, 2H), 4,33 (к,  $J=7,2$  Гц, 2H), 1,29 (т,  $J=6,8$  Гц, 3H).

**Общий способ G:** получение тиоэфиров из брома

Пример **F2:** этил-3-(бензилтио)-2-хлорбензоат

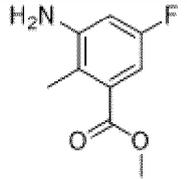
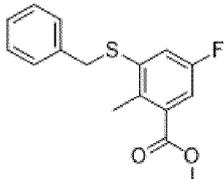
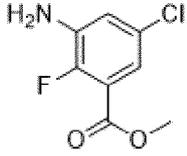
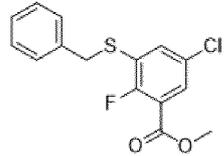
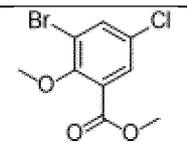
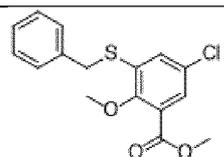
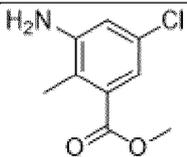
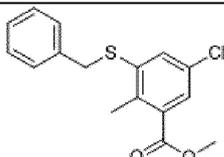
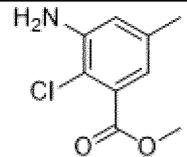
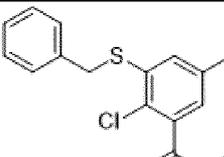
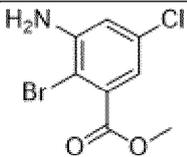
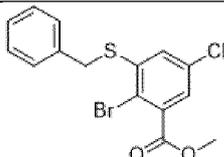


[000201] Раствор метил-3-бром-2-хлорбензоата (3,0 г, 12 ммоль), фенилметантиола (1,6 г, 13 ммоль) в толуоле (30 мл) обрабатывали DIEA (4,2 мл, 24 ммоль). Реакционную смесь продували  $\text{Ar}$  в течение 5 мин и затем добавляли XantPhos (0,67 г, 1,2 ммоль) и  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (0,55 г, 0,60 ммоль). Смесь продували  $\text{Ar}$  в течение 5 мин и нагревали до  $90^\circ\text{C}$  в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до к. т. и фильтровали через силикагель, промывали смесью EtOAc:гексаны (1:1). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали остаток с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 100% EtOAc:гексаны) с получением метил-3-(бензилтио)-2-хлорбензоата (2,8 г, 80%) в виде оранжевого маслянистого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  7,60 (дд,  $J=8,0$ , 1,5 Гц, 1H), 7,50 (дд,  $J=7,6$ , 1,5 Гц, 1H), 7,37-7,46 (м, 2H), 7,31-7,37 (м, 2H), 7,23-7,31 (м, 2H), 4,34 (с, 2H), 3,85 (с, 3H).

[000202] С применением вышеприведенных общих способов F и G получали следующие промежуточные соединения из таблицы F.

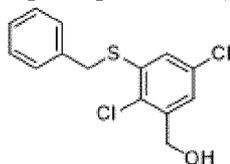
**Таблица F.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	$^1\text{H}$ ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): $\delta$
F3			41	7,59-7,72 (м, 1H), 7,48 (м, 1H), 7,38-7,44 (м, 2H), 7,20-7,26 (м, 2H), 7,15 (м, 1H), 4,03 (с, 2H), 3,77 (с, 3H).
F4			45	7,46-7,52 (м, 3H), 7,29-7,44 (м, 4H), 4,39 (с, 2H), 3,85 (с, 3H).

F5			24	7,39 (м, 3H), 7,24-7,34 (м, 4H), 4,32 (с, 2H), 3,81 (с, 3H), 2,32 (с, 3H).
F6			50	7,72 (м, 1H), 7,63 (м, 1H), 7,36 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,33 (т, J=6,8 Гц, 2H), 7,26 (м, 1H), 4,37 (с, 2H), 3,85 (с, 3H).
F7			74	7,55 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,47 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,41 (м, 2H), 7,33 (т, J=7,1 Гц, 2H), 7,24 (м, 1H), 4,14 (с, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,70 (с, 3H).
F8			42	7,54 (м, 1H), 7,50 (м, 1H), 7,39 (м, 2H), 7,32 (т, J=8,0 Гц, 2H), 7,26 (м, 1H), 4,32 (с, 2H), 3,82 (с, 3H), 2,35 (с, 3H).
F9			71	7,43 (м, 3H), 7,35 (м, 3H), 7,21 (м, 1H), 4,32 (с, 2H), 3,83 (с, 3H), 2,30 (с, 3H).
F10			60	7,53 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,51 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,26-7,45 (м, 5H), 4,41 (с, 2H), 3,89 (с, 3H).

**Общий способ Н:** восстановление

Пример **G1:** (3-(бензилтио)-2,5-дихлорфенил)метанол

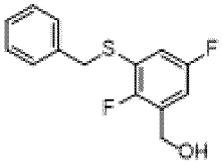
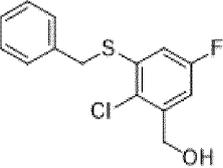
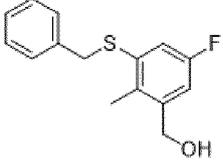
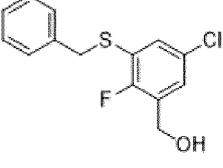
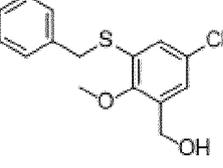
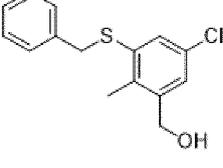


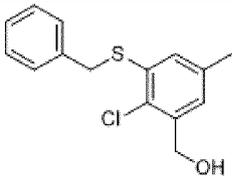
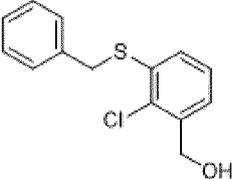
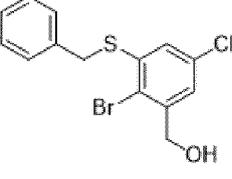
[000203] Смесь  $\text{CaCl}_2$  (0,45 г, 0,92 ммоль) и  $\text{NaBH}_4$  (6,20 г, 37 ммоль) в  $\text{EtOH}$  (200 мл) перемешивали при 0 °С. По каплям добавляли холодный раствор этил-3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензоата (**F1**, 14,0 г, 9,2 ммоль) в ТГФ (200 мл) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С, медленно нагревали до к. т. и затем нагревали при 60 °С в течение 5 ч. Реакционную смесь охлаждали до к. т., гасили насыщ. раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 мл) и затем экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (3x). Объединенные органические экстракты

высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (от 1 до 10%  $\text{EtOAc}$ /гексаны) с получением (3-(бензилтио)-2,5-дихлорфенил)метанола (8,0 г, 66%) в виде коричневого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7,44 (м, 2H), 7,35 (м, 3H), 7,25-7,32 (м, 2H), 5,57 (т,  $J=5,6$  Гц, 1H), 4,51 (д,  $J=6,0$  Гц, 2H), 4,36 (с, 2H).

[000204] С применением вышеприведенного общего способа Н получали следующие промежуточные соединения из таблицы G.

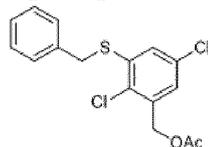
**Таблица G.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	$^1\text{H}$ ЯМР (400 или 500 МГц, $\text{DMSO-d}_6$ ): $\delta$
G2	F3		61	7,37 (м, 2H), 7,31 (м, 2H), 7,23 (м, 1H), 7,12 (м, 1H), 7,03 (м, 1H), 5,41 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 4,50 (д, $J=5,6$ Гц, 2H), 4,29 (с, 2H)
G3	F4		69	7,44 (м, 2H), 7,34-7,39 (м, 2H), 7,27 (м, 1H), 7,20 (м, 1H), 7,09 (м, 1H), 5,57 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,50 (д, $J=5,6$ Гц, 2H), 4,34 (с, 2H)
G4	F5		69	7,40 (м, 2H), 7,32 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,27 (м, 1H), 7,20 (м, 1H), 7,00 (м, 1H), 5,06 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 2,15 (с, 3H), 2,07 (с, 3H).
G5	F6		76	7,36 (м, 2H), 7,33 (м, 2H), 7,23-7,29 (м, 3H), 5,15 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 4,50 (д, $J=5,6$ Гц, 2H), 4,30 (с, 2H).
G6	F7		98	7,36 (м, 2H), 7,32 (м, 2H), 7,26 (м, 3H), 5,28 (т, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,46 (д, $J=5,2$ Гц, 2H), 4,23 (с, 2H), 2,12 (с, 3H).
G7	F8		87	7,36 (м, 2H), 7,32 (м, 2H), 7,26 (м, 3H), 5,28 (т, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,46 (д, $J=5,2$ Гц, 2H), 4,23 (с, 2H), 2,12 (с, 3H)

G8	F9		97	7,40 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,32 (т, J=7,2 Гц, 2H), 7,25 (м, 1H), 7,16 (с, 2H), 5,36 (т, J =5,6 Гц, 1H), 4,49 (д, J=5,6 Гц, 2H), 4,26 (с, 3H), 2,28 (с, 3H).
G9	F2		неочищенный	Данные отсутствуют
G10	F10		50	7,34-7,38 (м, 5H), 7,21 (шс, 1H), 7,14 (шс, 1H), 5,33 (т, J=6,0 Гц, 1H), 4,44 (д, J=6,0 Гц, 2H), 4,29 (с, 2H).

**Общий способ I:** ацетилирование

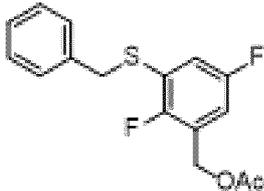
Пример **Н1:** 3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензилацетат

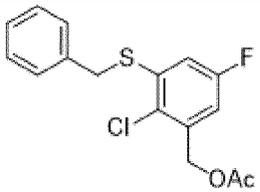
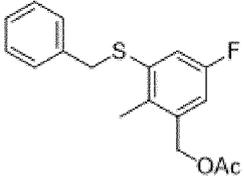
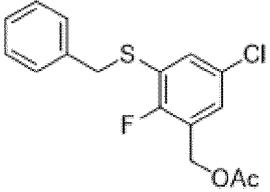
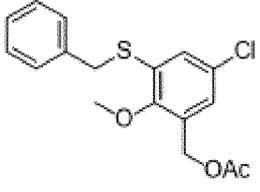
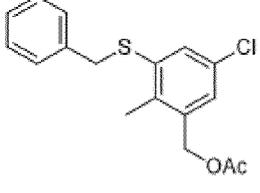
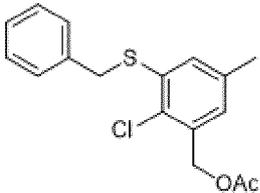
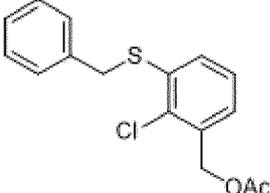
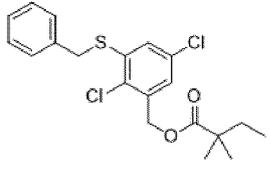


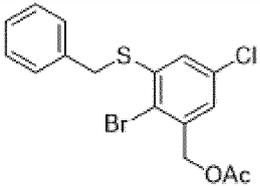
[000205] Раствор (3-(бензилтио)-2,5-дихлорфенил)метанола (**G1**, 0,82 г, 2,7 ммоль) в ТГФ (10 мл) обрабатывали уксусным ангидридом (0,31 мл, 3,3 ммоль) при к. т. Реакционную смесь перемешивали при 50 °С в атмосфере Ar в течение 2 ч. и затем разбавляли водой. Раствор экстрагировали EtOAc (3x) и высушивали объединенные органические слои над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензилацетата (0,92 г, 98%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 7,51 (м, 3H), 7,41 (м, 3H), 7,35 (м, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,45 (с, 2H), 2,16 (с, 3H).

[000206] С применением вышеприведенного общего способа I получали следующие промежуточные соединения из таблицы Н.

**Таблица Н.**

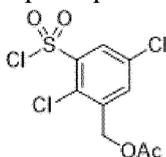
№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ
Н2	G2		46	7,39 (м, 2H), 7,31 (м, 3H), 7,26 (м, 1H), 7,12 (м, 1H), 5,06 (с, 2H), 4,32 (с, 2H), 2,06 (с, 3H).

H3	G3		55	7,42 (м, 2H), 7,27-7,35 (м, 4H), 7,13 (м, 1H), 5,10 (с, 2H), 4,36 (с, 2H), 2,10 (с, 3H).
H4	G4		63	7,33-7,39 (м, 2H), 7,25-7,32 (м, 2H), 7,17-7,22 (м, 1H), 7,15 (м, 1H), 7,00 (м, 1H), 5,06 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 2,15 (с, 3H), 2,07 (с, 3H).
H5	G5		70	7,48 (дд, J=2,4 и 5,6 Гц, 1H), 7,38-7,29 (м, 5H), 7,27 (м, 1H), 5,05 (с, 2H), 4,33 (с, 2H), 2,06 (с, 3H).
H6	G6		99	7,40 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,36 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,32 (т, J=7,2 Гц, 2H), 7,25 (м, 1H), 7,21 (д, J =2,4 Гц, 1H), 5,03 (с, 2H), 4,29 (с, 2H), 3,71 (с, 3H), 2,00 (с, 3H).
H7	G7		94	7,38 (м, 3H), 7,31 (т, J=6,8 Гц, 2H), 7,27 (м, 1H), 7,21 (м, 1H), 5,06 (д, J=4,4 Гц, 2H), 4,27 (с, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,06 (с, 3H).
H8	G8		98	7,42 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,35 (т, J=7,2 Гц, 2H), 7,27 (м, 2H), 7,22 (м, 1H), 5,08 (с, 2H), 4,29 (с, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,05 (с, 3H).
H9	G9		94	Данные отсутствуют
H10	G1		75	7,30-7,46 (м, 7H), 5,10 (с, 2H), 4,38 (с, 2H), 1,49 (м, 2H), 1,08 (с, 6H), 0,77 (т, J=5,2 Гц, 3H),

H11	G10		90	7,33-7,41 (м, 5H), 7,16-7,30 (м, 2H), 5,08 (с, 2H), 4,38 (с, 2H), 2,10 (с, 3H).
-----	-----	---	----	---

**Общий способ J:** получение сульфонилхлоридов

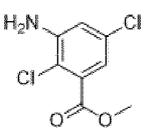
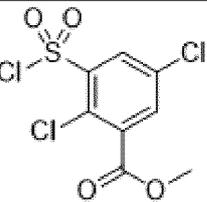
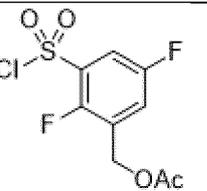
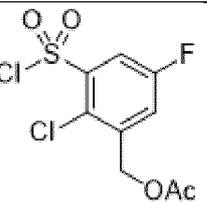
Пример **И1:** 2,5-дихлор-3-(хлорсульфонил)бензилацетат

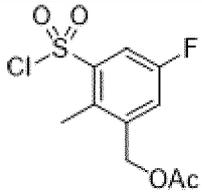
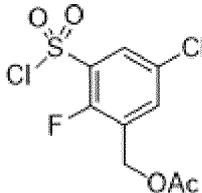
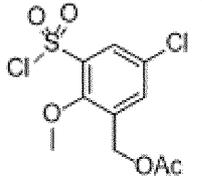
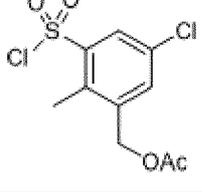
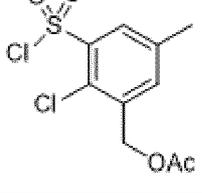
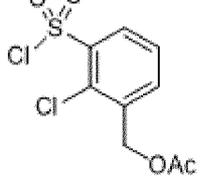
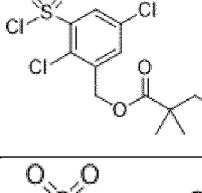


[000207] Раствор 3-(бензилтио)-2,5-дихлорбензилацетата (**И1**, 0,92 г, 2,7 ммоль) и 1-хлорпирролидин-2,5-диона (1,8 г, 13 ммоль) в ТГФ/Н<sub>2</sub>О (1:1, 3 мл) при 0°С обрабатывали уксусной кислотой (7 мл). Реакционную смесь медленно нагревали до к. т. и затем перемешивали при к. т. в течение 6 ч. Реакционную смесь гасили насыщ. раствором NaHCO<sub>3</sub> (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3x). Объединенные органические слои высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 100% EtOAc/гексаны) с получением 2,5-дихлор-3-(хлорсульфонил)бензилацетата (0,45 г, 53%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 7,84 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,52 (д, J=2,8 Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 2,11 (с, 3H).

[000208] С применением вышеприведенного общего способа J получали следующие промежуточные соединения из таблицы I.

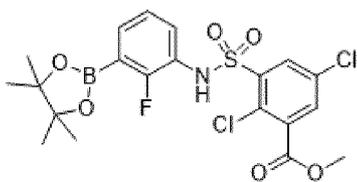
**Таблица I.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ
I2			53	7,99 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,74 (д, J=2,7 Гц, 1H), 3,87 (с, 4H).
I3	H2		59	7,35 (м, 1H), 7,27 (м, 1H), 5,08 (с, 2H), 2,08 (с, 3H).
I4	H3		57	7,61 (дд, J=8,4, 3,2 Гц, 1H), 7,32 (дд, J=8,8, 3,2 Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 2,12 (с, 3H).

I5	H4		72	7,49 (дд, J=9,2, 2,8 Гц, 1H), 7,14 (дд, J=9,2, 2,8 Гц, 1H), 5,07 (с, 2H), 2,44 (с, 3H), 2,08 (с, 3H).
I6	H5		84	7,60 (дд, J=5,6, 2,8 Гц, 1H), 7,50 (дд, J=5,6, 2,8 Гц, 1H), 5,08 (с, 2H), 2,07 (с, 3H).
I7	H6		47	Данные отсутствуют
I8	H7		41	7,74 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,35 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,07 (с, 2H), 2,46 (с, 3H), 2,07 (с, 3H).
I9	H8		37	7,70 (д, J=1,2 Гц, 1H), 7,23 (с, 1H), 5,10 (с, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,08 (с, 3H).
I10	H9		92	7,88 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,29 (м, 1H), 7,43 (д, J=7,2 Гц, 1H), 5,15 (с, 2H), 2,09 (с, 3H).
I11	H10		80	7,85 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,48 (д, J=2,8 Гц, 1H), 5,11 (с, 2H), 1,46 (м, 2H), 1,05 (с, 6H), 0,83 (т, J=5,2 Гц, 3H).
I12	H11		32	7,88 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,47 (д, J=2,8 Гц, 1H), 5,12 (с, 2H), 2,14 (с, 3H).

**Общий способ К:** сочетание с образованием сульфонамида

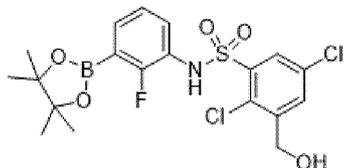
Пример **Ж1:** метил-2,5-дихлор-3-(N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)сульфамойл)бензоат



[000209] Раствор 2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)анилина (**A1**, 2,2 г, 9,3 ммоль) в ДХМ (30 мл) обрабатывали пиридином (2,2 мл, 28 ммоль). Охлаждали реакционную смесь до 0°C и по каплям добавляли раствор метил-2,5-дихлор-3-(хлорсульфонил)бензоата (**I2**, 2,8 г, 9,3 ммоль) в ДХМ (10 мл). Реакционную смесь медленно нагревали до к. т. в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и растворяли неочищенный остаток в ДХМ (50 мл). Раствор промывали с помощью 1,0 М HCl (2x), водного NaHCO<sub>3</sub> (3x) и насыщенного солевого раствора (1x). Высушивали органический слой над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток суспендировали в гексанах и собирали твердые вещества с помощью вакуумной фильтрации с получением метил-2,5-дихлор-3-(N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)сульфамойл)бензоата (4,2 г, 90%) в виде коричневого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,71 (с, 1H), 8,13 (д, J=2,6 Гц, 1H), 8,02 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,46 (м, 1H), 7,38 (тд, J=7,9, 1,8 Гц, 1H), 7,16 (т, J=7,7 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 1,28 (с, 12H); MS (ИЭР) m/z 526,0 (M+Na+H<sup>+</sup>).

**Общий способ L:** восстановление

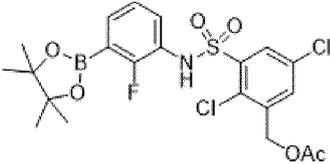
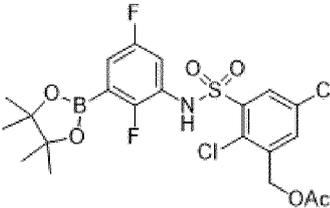
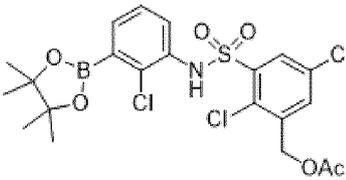
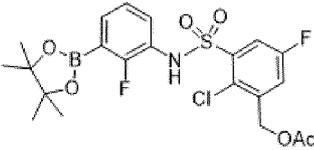
Получение примера **J2**: 2,5-дихлор-N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)-3-(гидроксиметил)бензолсульфонамид

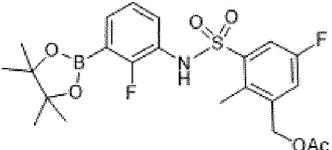
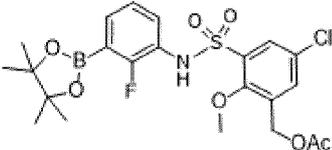
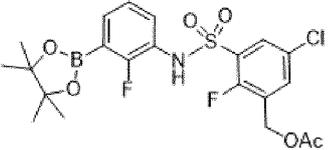
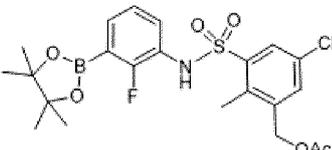


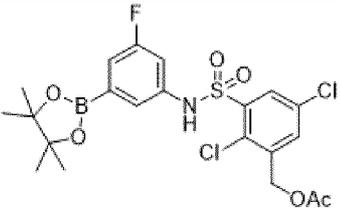
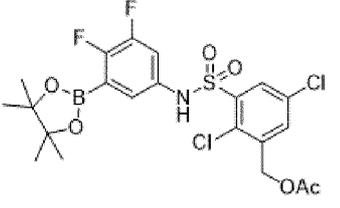
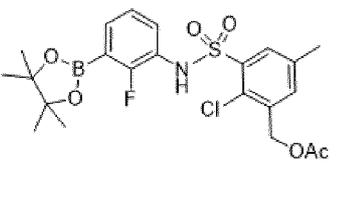
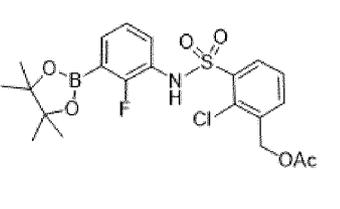
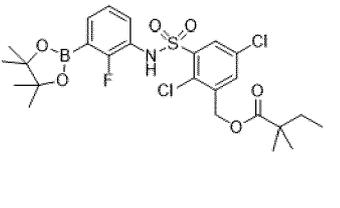
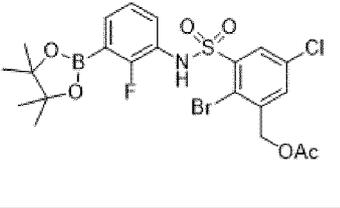
[000210] Раствор метил-2,5-дихлор-3-(N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)сульфамойл)бензоата (**J1**, 0,5 г, 0,99 ммоль) в ТГФ (5 мл) обрабатывали порциями ЛАН (0,11 г, 30 ммоль) при 0°C и затем перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли диэтиловым эфиром и затем гасили водой (0,2 мл), 15% водным NaOH (0,2 мл) и водой (0,4 мл). Смесь перемешивали в течение 4 ч. и затем фильтровали через слой целита. Фильтрат высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 2,5-дихлор-N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)-3-(гидроксиметил)бензолсульфонамида (0,26 г, 55%) в виде бесцветного твердого вещества, которое использовали для следующей реакции без дополнительной очистки. MS (ИЭР) m/z 498,0 (M+Na+H<sup>+</sup>).

[000211] С применением вышеприведенных общих способов K и L получали следующие промежуточные соединения из таблицы J.

**Таблица J.**

№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ	МС (m/z: M+H <sup>+</sup> )
J3	A1 I1		77	10,64 (шс, 1H), 7,85 (м, 2H), 7,41 (м, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,12 (т, J=7,6 Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 2,12 (с, 3H), 1,26 (с, 12H).	516,0 (отриц.)
J4	A3 I1		неочищенный	Данные отсутствуют	452 (отриц.) масса боронированной кислоты
J5	A5 I1		неочищенный	10,50 (шс, 1H), 7,87 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,85 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,52 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,47 (дд, J=6,4, 2,8 Гц, 1H), 5,22 (с, 2H), 2,12 (с, 3H).	Данные отсутствуют
J6	A1 I4		86	10,61 (шс, 1H), 7,70 (м, 1H), 7,55 (т, J=7,2 Гц, 1H), 7,43 (т, J=5,6 Гц, 1H), 7,35 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,13 (т, J=7,6 Гц, 1H), 5,21 (с, 2H), 2,13 (с,	

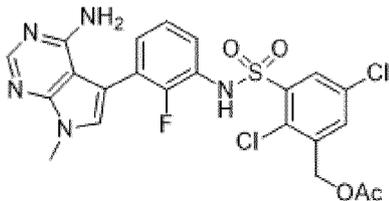
				3H), 1,22 (с, 12H)	
J7	A1 I5		неочищенный	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют
J8	A1 I7		98	10,15 (шс, 1H), 7,74 (м, 1H), 7,64 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,41 (т, J=5,6 Гц, 1H), 7,33 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,11 (т, J=8,0 Гц, 1H), 5,14 (с, 2H), 3,84 (с, 3H), 2,10 (с, 3H), 1,27 (с, 12H)	512,2
J9	A1 I6		60	7,88 (м, 1H), 7,66 (м, 1H), 7,45-7,51 (м, 1H), 7,38 (м, 1H), 7,15 (м, 1H), 5,14 (с, 2H), 2,07 (с, 3H), 1,26 (с, 12H). NH отсутствует	Данные отсутствуют
J10	A1 I8		неочищенный	10,49 (шс, 1H), 7,71 (м, 2H), 7,33-7,42 (м, 2H), 7,13 (т, J=7,6 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 2,53 (с, 3H), 2,09 (с, 3H), 1,26 (с, 12H).	

J11	A2 II		неочищенный	Данные отсутствуют	434,2 боронов ая кислота
J12	A4 II		неочищенный	Данные отсутствуют	452,2 боронов ая кислота
J13	A1 I9		неочищенный	Данные отсутствуют	414,0 боронов ая кислота
J14	A1 II0		неочищенный	Данные отсутствуют	424,0 боронов ая кислота +Na
J15	A1 II1		50	10,15 (шс, 1H), 7,88 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,82 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,78 (м, 1H), 7,07-7,11 (шм, 1H), 6,73- 6,76 (шм, 1H), 5,19 (с, 2H), 1,53 (м, 2H), 1,27 (с, 12H), 1,13 (с, 6H), 0,76 (т, J=4,4 Гц, 3H).	572,0 (отриц.)
J16	A1 II2		60	10,59 (шс, 1H), 8,82 (м, 2H), 8,32 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,82-8,03 (м, 2H),	561.9

				5,12 (с, 2H), 2,13 (с, 3H), 1,27 (с, 12H).
--	--	--	--	--

**Общий способ М:** реакция Сузуки

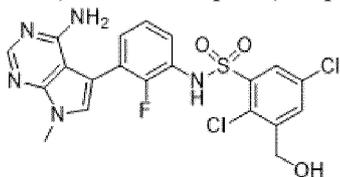
Пример 1: 3-(N-(3-(4-амино-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-фторфенил)сульфамоил)-2,5-дихлорбензилацетат



[000212] Раствор 5-йод-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амина (1,7 г, 6,3 ммоль) в смеси 1,4-диоксана и воды (4:1, 100 мл) перемешивали в атмосфере Ar. Добавляли 2,5-дихлор-3-(N-(2-фтор-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)сульфамоил)бензилацетат (3,6 г, 6,9 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (5,1 г, 15,7 ммоль) при к. т. и дегазировали реакционную смесь с помощью Ar в течение 5 мин. Добавляли  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{DHM}$  (0,25 г, 0,31 ммоль) и нагревали полученную смесь при  $90^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до к. т. и фильтровали через слой целита, промывали  $\text{EtOAc}$ . Фильтрат промывали насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  (2х), затем водой (2х). Высушивали органический слой над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного вещества. Дополнительно перемешивали неочищенное вещество в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (300 мл) при к.т. в течение 2 ч. Твердые вещества фильтровали и высушивали под вакуумом с получением 3-(N-(3-(4-амино-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-фторфенил)сульфамоил)-2,5-дихлорбензилацетата (2,5 г, 91%) в виде светло-коричневого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  10,76 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,93 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 7,84 (м, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,19 (м, 3H), 6,02 (шс, 2H), 5,20 (с, 2H), 3,73 (с, 3H), 3,56 (с, 3H); МС (ИЭР)  $m/z$  538,0 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**Общий способ N:** удаление защитной группы

Пример 2: N-(3-(4-амино-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-фторфенил)-2,5-дихлор-3-(гидроксиметил)бензолсульфонамид

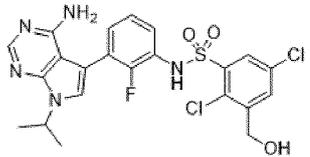
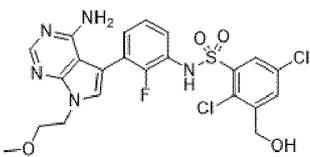


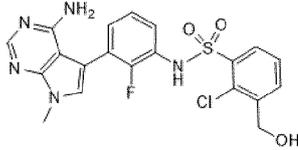
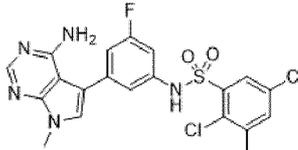
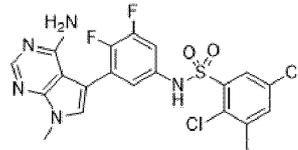
[000213] Раствор 3-(N-(3-(4-амино-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-фторфенил)сульфамоил)-2,5-дихлорбензилацетата (1, 2,3 г, 4,2 ммоль) в  $\text{MeOH}$  (40 мл) обрабатывали  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,3 г, 17 ммоль) при к. т. Смесь перемешивали при к. т. в течение 3 ч. и затем выпаривали растворитель при пониженном давлении. Неочищенный материал

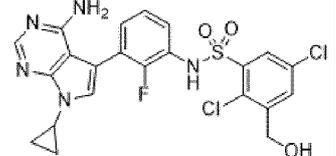
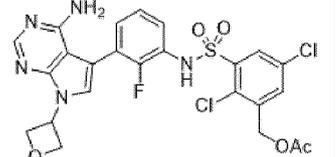
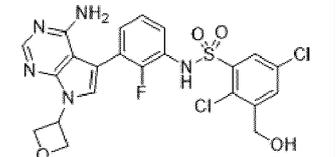
подкисляли 10% раствором лимонной кислоты (pH~5), а затем твердое вещество отфильтровывали и тщательно промывали водой. Твердое вещество обрабатывали смесью CH<sub>3</sub>CN (5 мл) и ДХМ (5 мл) при к. т. в течение 2 ч. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением N-(3-(4-амино-7-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-фторфенил)-2,5-дихлор-3-(гидроксиметил)бензолсульфонамида (1,6 г, 76%) в виде грязновато-белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,69 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,84 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,78 (шм, 1H), 7,27 (с, 1H), 7,15-7,25 (шм, 3H), 5,99 (шс, 2H), 5,72 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,60 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H). МС (ИЭР) m/z 496,27 (M+H<sup>+</sup>).

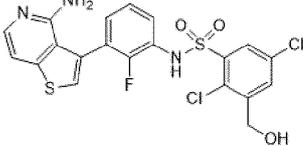
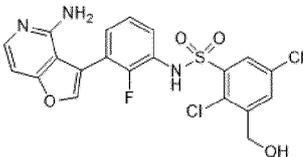
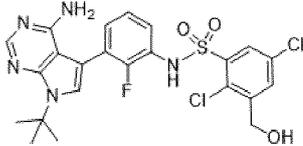
С применением вышеприведенных общих способов L, M и N получали следующие промежуточные соединения из таблицы К.

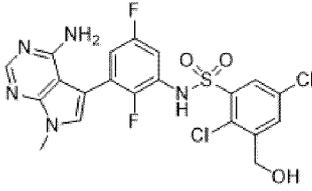
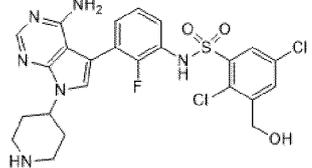
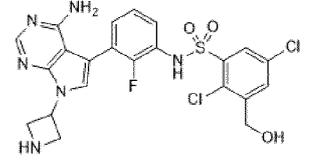
**Таблица К.**

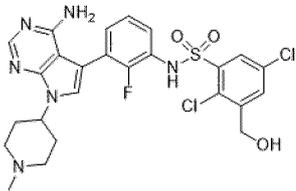
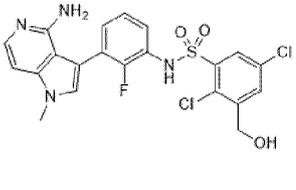
№ прим.	Исходное в-во	Продукт	Способ	Выход (%)	<sup>1</sup> H ЯМР (400 или 500 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ): δ	МС (m/z: M+H <sup>+</sup> )
3	E1 J2		M	13	10,73 (с, 1H), 8,13 (д, J=1,1 Гц, 1H), 7,86 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,78 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,14-7,27 (м, 3H), 6,00 (с, 2H), 5,75 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,95 (м, 1H), 4,61 (д, J=5,7 Гц, 2H), 1,44 (д, J=6,7 Гц, 6H).	524,0
4	E3 J1		M и L	15	10,75 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,87 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,30 (с, 1H), 7,21 (м, 3H), 6,06 (с, 2H), 5,76 (т, J=6,3 Гц, 1H), 4,62 (д, J=5,6 Гц, 2H), 4,33 (т, J=5,4 Гц, 2H),	540,0

					3,69 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,24 (с, 3H).	
5	E2 J14		М и N	6	1H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 10,60 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 7,88 (дд, J=7,8, 1,7 Гц, 1H), 7,74-7,62 (м, 1H), 7,49-7,39 (м, 1H), 7,24 (с, 1H), 7,13-7,09 (м, 1H), 7,05-6,92 (м, 2H), 5,99 (шс, 2H), 5,52 (с, 1H), 4,59 (д, J=5,5 Гц, 2H), 3,72 (с, 3H).	462,0
6	E2 J11		М и N	10	11,26 (с, 1H), 8,36 (с, 1H), 8,05 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,81 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,48 (с, 1H), 7,20-7,43 (шс, 2H), 6,98 (с, 1H), 6,94 (шд, J=9,6, 1H), 6,88 (шд, J=10,9 Гц, 1H), 5,72 (шс, 1H), 4,58 (с, 2H), 3,79 (с, 3H),	496,2
7	E2 J12		М и N	10	10,77 (шс, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,24 (с, 1H), 7,05 (м, 1H), 6,92 (шм, 1H), 5,90	514,1

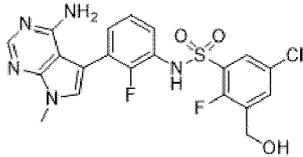
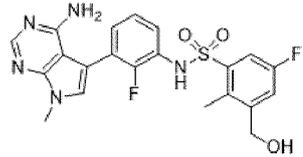
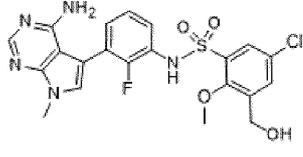
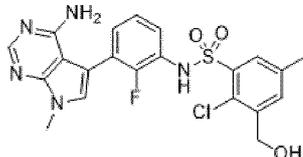
					(шс, 2H), 5,48 (т, J=5,5 Гц, 1H), 4,61 (д, J=4,8 Гц, 2H), 3,75 (с, 3H). При высокой темп.	
8	E4 J1		М и L	14	10,64 (с, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,78 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,76 (м, 1H), 7,13 (д, J=2,8 Гц, 4H), 5,92 (с, 2H), 5,67 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,54 (д, J=5,7 Гц, 2H), 3,50 (м, 1H), 1,0 (м, 4H).	522,0
9	E5 J3		М	21	10,80 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,87 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,67 (с, 1H), 7,30 (тд, J=6,3, 3,5 Гц, 1H), 7,23 (м, 2H), 6,10 (с, 2H), 5,86 (п, J=7,2 Гц, 1H), 5,21 (с, 2H), 4,99 (м, 4H), 2,09 (с, 3H).	580,0
10	9		N	20	10,75 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,87 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,80 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,30 (м, 1H), 7,23 (м, 2H), 6,11 (с, 2H), 5,86 (тт, J=7,7, 6,7	538,0

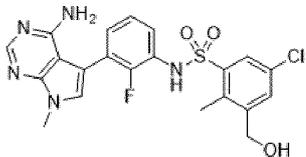
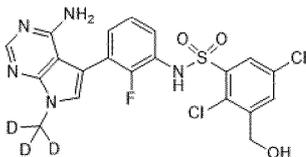
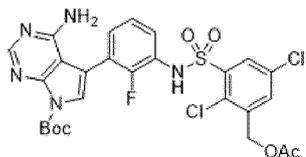
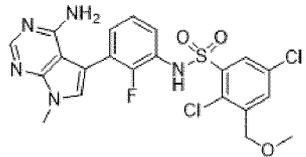
					Гц, 1H), 5,75 (м, 1H), 4,99 (п, J=6,9 Гц, 4H), 4,62 (д, J=5,5 Гц, 2H).	
11	 J1		М и L	22	10,86 (с, 1H), 7,86 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,83 (д, J=5,6 Гц, 1H), 7,78 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,53 (с, 1H), 7,38-7,33 (м, 1H), 7,29 (д, J=5,7 Гц, 1H), 7,27-7,24 (м, 2H), 5,72 (т, J=5,8 Гц, 1H), 5,24 (с, 2H), 4,60 (д, J=4,8 Гц, 2H).	499,0
12	 J1		М и L	32	10,84 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,91-7,83 (м, 2H), 7,78 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,36-7,21 (м, 3H), 6,96 (д, J=5,9 Гц, 1H), 5,72 (т, J=5,7 Гц, 1H), 5,45 (с, 2H), 4,61 (д, J=5,4 Гц, 2H).	483,0
13	E6 J1		М и L	15	10,62 (с, 1H), 8,07 (с, 1H), 7,78 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,72 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,13 (м, 4H), 5,85 (с, 2H), 5,66 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,54 (д, J=5,6 Гц, 2H), 1,65 (с, 9H).	538,0

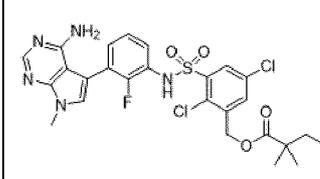
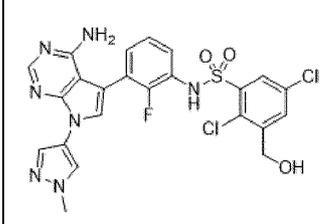
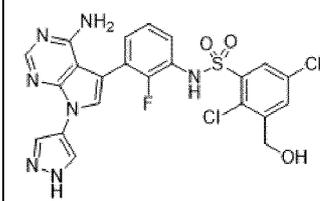
14	E2 J4		M и N	10	11,03 (шс, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,33 (с, 1H), 6,98-7,07 (м, 2H), 6,21 (шс, 2H), 5,72 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,60 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H).	514,2
15	E8 J3		M и N	23	8,62 (с, 2H), 8,06 (с, 1H), 7,78 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,50 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,99 (м, 2H), 6,85 (т, J=7,8 Гц, 1H), 6,57 (т, J=7,0 Гц, 1H), 5,94 (с, 2H), 5,53 (с, 1H), 4,80 (тт, J=11,9, 4,2 Гц, 1H), 4,50 (с, 2H), 3,36 (м, 2H), 3,05 (тд, J=12,9, 3,1 Гц, 2H), 2,11 (тт, J=12,8, 6,6 Гц, 2H), 2,03 (дд, J=13,5, 3,6 Гц, 2H).	565,0
16	E7 J3		M и N	9	8,10 (с, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,80 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,53 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,03 (тт, J=8,1, 1,7 Гц, 1H), 6,88 (т, J=7,8	537,0

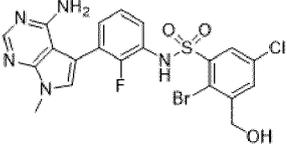
					Гц, 1H), 6,66 (с, 1H), 5,54 (п, J=7,9 Гц, 1H), 4,46-4,53 (м, 5H), 4,32 (м, 2H). 3H отсутствуют	
17	E9 J3		М и N	25	8,14 (с, 1H), 7,87 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,71 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,15 (тд, J=7,8, 1,8 Гц, 1H), 7,08 (т, J=7,8 Гц, 1H), 7,00 (т, J=7,2 Гц, 1H), 6,01 (с, 2H), 5,69 (с, 1H), 4,64 (м, 1H), 4,61 (с, 2H), 3,11 (м, 2H), 2,43 (с, 3H), 2,43-2,50 (м, 3H), 2,15 (м, 2H), 1,94-2,04 (м, 2H).	580,0
18	E12 J3		М и N	14	10,5 (шс, 1H), 7,86 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,67 (м, 2H), 7,33 (с, 1H), 7,16 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,04 (т, J=7,7 Гц, 1H), 6,99 (д, J=6,4 Гц, 1H), 6,91 (шм, 1H), 5,81 (шс, 2H), 5,65 (т, J=5,9 Гц, 1H), 4,58 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,79 (с, 3H)	495,3

19	E2 J6		М и N	35	10,7 (шс, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,68 (дд, J=8,0, 3,2 Гц, 1H), 7,60 (дд, J=8,8, 2,8 Гц, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,18-7,20 (м, 3H), 6,00 (шс, 2H), 5,73 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,61 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H).	480,3
20	E2 J5		М и N	8	10,5 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,79 (шм, 2H), 7,35 (т, J=8,4 Гц, 1H), 7,28 (м, 1H), 7,25 (с, 1H), 7,22 (дд, J=8,0, 1,6 Гц, 1H), 5,84 (шс, 2H), 5,72 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,61 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H).	512,3
21	J3		М и N	25	10,74 (м, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,87 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,29 (м, 1H), 7,19 (с, 2H), 5,68 (т, J=5,8 Гц, 1H), 4,60 (д, J=5,7 Гц, 2H), 3,94 (с, 3H). 2H отсутствуют	497,0

22	E2 J9		М и N	25	10,72 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,75 (шм, 1H), 7,61-7,67 (м, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,18-7,25 (шм, 3H), 5,98 (шс, 2H), 5,93 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,57 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H).	480,0
23	E2 J7		М и N	9	10,51 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,44-7,52 (шм, 2H), 7,25 (с, 1H), 7,16 (шм, 3H), 5,97 (шс, 2H), 5,48 (т, J=5,2 Гц, 1H), 4,55 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,72 (с, 3H), 2,45 (с, 3H).	460,0
24	E2 J8		М и N	54	10,24 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,69 (шс, 1H), 7,63 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,10-7,24 (м, 3H), 5,99 (шс, 2H), 5,51 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,57 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 3,73 (с, 3H).	492,1
25	E2 J13		М и N	78	10,40 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,71 (шс, 1H), 7,60 (шс, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,18 (шм, 3H), 5,96	476,2

					(шс, 2H), 5,54 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,58 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,72 (с, 3H), 2,34 (с, 3H)	
26	E2 J10		М и N	36	10,52 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,72 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,68 (шд, J=2,0 Гц, 1H), 7,25 (с, 1H), 7,19 (шм, 3H), 5,97 (шс, 2H), 5,48 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,56 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,72 (с, 3H). 3H находятся под пиками растворителей	476,3
27	E10 J3		М и N	19	10,68 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,86 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,75 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,27 (с, 1H), 7,12-7,21 (м, 3H), 5,99 (с, 2H), 5,71 (т, J=5,8 Гц, 1H), 4,61 (д, J=5,5 Гц, 2H).	499,0
28	A1E1 I и затем II		М и К	неочищенный	Данные отсутствуют	623,9
29	2		POCl <sub>3</sub> NaOMe	45	10,72 (шс, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,88 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,75 (д, J=2,4 Гц,	510,0

					1H), 7,27 (с, 1H), 7,20 (м, 3H), 6,00 (шс, 2H), 4,55 (с, 2H), 3,73 (с, 3H), 3,38 (с, 3H).	
30	E2 J15		М	26	10,74 (шс, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,93 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,25 (с, 1H), 7,19 (м, 3H), 5,99 (шс, 2H), 5,19 (с, 2H), 3,72 (с, 3H), 1,45 (к, J=7,6 Гц, 2H), 1,06 (с, 6H), 0,70 (т, J=7,6 Гц, 3H).	594,1
31	E13 J3		М и N	26	10,74 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,87 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,77 (шс, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,22 (шм, 3H), 6,12 (шс, 2H), 5,72 (т, J=5,2 Гц, 1H), 4,60 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,91 (с, 3H).	562,2
32	E14 J3		М и N	8	13,06 (шс, 1H), 10,74 (шс, 1H), 8,35 (шм, 1H), 8,22 (с, 1H), 8,09 (шм, 1H), 7,87 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,76 (шс, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,22 (шм,	548,1

					3H), 6,11 (шс, 2H), 5,71 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,60 (д, J=5,6 Гц, 2H).	
33	E2 J16		М и N	12	10,65 (шс, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,88 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,74 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,17-7,22 (м, 3H), 6,01 (шс, 2H), 5,77 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,56 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,73 (с, 3H).	540,2

### Пример 30. Биохимический анализ в отношении GCN2

[000214] Активность киназы GCN2 определяли с применением анализа киназной активности TR-FRET (например, Riddle *et al.* Analytical Biochemistry (2006) 356(1) 108-116). Анализы проводили в 384-луночных планшетах (анализуемый объем 13 мкл) с применением 2 нМ GCN2 (Carna Biosciences), 130 нМ GFP-Elf2 $\alpha$  (Invitrogen), 0,2 мг/мл тРНК *E. coli* (Sigma) и 1 мМ АТФ в киназном буфере (Invitrogen). Ингибирование GCN2 измеряли путем добавления серийных разведений тестового соединения (конечная аналитическая концентрация 0,5% ДМСО), после чего следовало 3-часовое инкубирование. Добавляли антитело Tb-peIF2 $\alpha$  (pSer52) (Invitrogen) (конечная аналитическая концентрация 2 нМ) в киназном буфере, содержащем ЭДТК (конечная аналитическая концентрация 20 мМ). Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре контролировали TR-FRET с применением длины волны возбуждения 340 нМ и значений длины волны испускания 490 нм и 520 нм. Соотношение испускания (520/490) для каждой концентрации соединения преобразовывали в процент ингибирования с применением контролей (т. е. реакции без тестового соединения и реакции с известным ингибитором) и значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением аппроксимации четырехпараметрической сигмоидальной кривой относительно данных с применением Prism (программное обеспечение GraphPad).

SEQ ID NO: 1 - последовательность белка GCN2 (остатки 1-1649; G556E с N-концевой GST-меткой)

MAPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPN  
LPYYIDGDVKTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD  
FETLKVDVFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLD  
AFPKLVCFFKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPKSDLEVLFGQPLGA

MGSGIQRPTSTSSSLVMAGGRGAPGRGRDEPPESYPQRQDHELQALEAIYGADFQDLRPD  
 ACGPVKEPPEINLVLYPQGLTGEEVYVKVDLRVKCPPTYPDVVPEIELKNAKGLSNESV  
 NLLKSRLEELAKKHCGEVMIFELAYHVQSFLSEHNKPPPKSFHEEMLERRAQEEQQRLL  
 EAKRKEEQEQREILHEIQRRKEEIKKEKKRKEMAKQERLEIASLSNQDHTSKKDPGGHRT  
 AAILHGGSPDFVGNKHRANSSGRSRERQYSVCNSEDSPGSCEILYFNMGSPDQLMVH  
 KGKICIGDEQLGKLVYNALETATGGFVLLYEWVLQWQKKMGPFLTSQEKEKIDKCKKQI  
 QGTETEFNSLVKLSHPNVVRYLAMNLKEQDDSIIVDILVEHISGVSLAAHLSHSGPIPVH  
 QLRRYTAQLLSGLDYLSNSVVKVLSASNVLVDAEGTVKITDYSISKRLADICKEDVF  
 EQTRVRFSDNALPYKTGKKGDVWRLGLLLLSLSQGQECGEYPVTIPSDLPADFDLKK  
 CVCLDDKERWSPQQLKHSFINPQPKMPLVEQSPEDSGGQDYVETVIPS NRLPSAAFFSE  
 TQRQFSRYFIEFEELQLLGKGAFGAVIKVQNKLDGCCYAVKRIPINPASRQFRRIKGEVTL  
 LSRLHHENIVRYNAWIERHERPAGPGTPPPDSGPLAKDDRAARGQPASDTDGLDSVEA  
 AAPPPILSSSVIEWSTSGERSASARFPATGPGSSDDEDEDEHGGVFSQSFLPASDESSEDI  
 FDNEDENSKSQNQDEDCNEKNGCHESEPSVTTEAVHYLYIQMEYCEKSTLRDTIDQGLY  
 RDTVRLWRLFREILDGLAYIHEKGMHRDLKPVNIFLSDDDHVKIGDFGLATDHLAFSA  
 DSKQDDQTGDLIKSDPSGHLTG MVGTALYVSPEVQGSTKSAYNQKVDLFSLGIFFEMS  
 YHPMVTASERIFVLNQLRDPTSPKFPEDFDDGEHAKQKSVISWLLNHDPKRPTATELL  
 KSELLPPPQMESELHEVLHHTLTNVDGKAYRTMMAQIFSQRISPAIDYTYDSDILKGNF  
 SIRTAKMQQHVCETIIRIFKRHGAVQLCTPLLLPRNRQIYEHNEAALFMDHSGMLVMLPF  
 DLRIPFARYVARNNILNLKRYCIERVFRPRKLD RFHPKELLECAFDIVTSTTNSFLPTAEII  
 YTIYEIIQEFPALQERNYSIYLNHTMLLKAILLHCGIPEDKLSQVYIILYDAVTEKLRREV  
 EAKFCNLSLSSNSLCRLYKFIEQKGDLDLMPTINSLIKQKTGIAQLVKYGLKDLEEVVG  
 LLKKGILKQLVLINLGLVYKVQQHNGIIFQFVAFIKRRQRAVPEILAAGGRYDLLIPQFRG  
 PQALGPVPTAIGVSIADKISA AVLNMEESVTISSCDLLVSVGQMSMSRAINLTQKLWT  
 AGITAEIMYDWSQSQEELQEYCRHNEITYVALVSDKEGSHVKVKSFEKERQTEKRVLET  
 ELVDHVLQKLRTKVTDERNGREASDNLAVQNLKGSFSNASGLFEIHGATVVPIVSVLAP  
 EKLSASTRRRYETQVQTRLQTSLANLHQKSSEIEILAVDLPKETILQFLSLEWDADEQAF  
 NTTVKQLLSRLPKQRYLKLVCDEIYNIKVEKKVSVLFLYSYRDDYYRILF

### **Пример 31. Биохимический анализ в отношении PERK**

[000215] Активность PERK определяли спектроскопически с применением анализа с использованием комбинации пируваткиназы/лактатдегидрогеназы, в котором осуществляется непрерывный мониторинг зависимого от гидролиза АТФ окисления NADH (например, Schindler *et al.* Science (2000) 289: 1938-1942). Анализы проводили в 384-луночных планшетах (конечный объем 100 мкл) с применением 10 нМ PERK (от Beryllium), 0,25 мг/мл основного белкового субстрата миелина, 1,5 единицы пируваткиназы, 2,1 единицы лактатдегидрогеназы, 1 мМ фосфоенолпирувата, 0,28 мМ NADH и 1 мМ АТФ в аналитическом буфере (100 мМ Tris, pH 7,5, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ DTT, 0,004% (масс./об.) BSA и 0,004% Triton X-100). Ингибирование PERK измеряли путем добавления серийных разведений тестового соединения (конечная аналитическая концентрация 1% ДМСО). Мониторинг снижения значения поглощения при 340 нм

осуществляли непрерывно в течение 6 часов при 30 °С на многорежимном устройстве для считывания микропланшетов (BioTek). Скорость реакции рассчитывали с применением отрезка времени 2-3 часа. Скорость реакции при каждом значении концентрации соединения преобразовывали в процент ингибирования с применением контролей (т. е. реакция без тестового соединения и реакция с известным ингибитором) и значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением программного обеспечения в Prism (программное обеспечение GraphPad).

SEQ ID NO: 2 - последовательность белка PERK (остатки 563-1115; ID последовательности: NM 004836)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPN  
LPYYIDGDVCLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKD  
FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLD  
AFPKLVCFFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPKSDLVPRGSKYDS  
VSGEANDSSWNDIKNSGYISRYLTDFEPIQCLGRGGFGVVFEAKNKVDDCNYAIKRIRLP  
NRELAREKVMREVKALAKLEHPGIVRYFNAWLEAPPEKWQEKMDEIWLKDESTDWPL  
SSPSPMDAPSVKIRRMDFSTKEHIEIAPSPQRSRSFSVGISCDQTSSSESQFSPLEFSGMD  
HEDISESVDAAYNLQDSCLTDCDVEDGTMDGNDEGHSELCPEASPYVRSRERTSSSIV  
FEDSGCDNASSKEEPKTNRHLHIGNHCANKLTA FKPTSSKSSSEATLSISPPRPTTSLDLTK  
NTTEKLQPSSPKVYLYIQMQLCRKENLKDWMNGRCTIEERERSVCLHIFLQIAEAVEFLH  
SKGLMHRDLKPSNIFFTMDDVVKVGDVGLVTAMDQDEEEQTVLTPMPAYARHTGQVG  
TKLYMSPEQIHGNSYSHKVDIFSLGLILFELLYPFSTQMERVRTLTDVRNLKFPPLFTQKY  
PCEYVMVQDMLSPSPMERPEAINIENAVFEDLDFPGKTVLRQRSRSLSSSGTKHSRQSN  
NSHSPLPSN

**Таблица 1. Ингибирование биохимической активности киназ GCN2 и PERK иллюстративными соединениями.**

№ примера	GCN2 IC <sub>50</sub> (нМ)	PERK IC <sub>50</sub> (нМ)
1	++++	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	++++	+
6	++	+
7	++	+
8	+	+
9	++++	+
10	+	+
11	++	+

12	++	+
13	++	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	++++	+
19	++	+
20	++	+
21	+	+
22	++	+
23	++	+
24	++++	+
25	++	+
26	+	+
27	+	+
29	++	+
30	++++	++++
31	+	+
32	+	+
33	+	+

[000216] Для таблицы 1 «+» относится к  $IC_{50}$ , составляющей 100 нМ или менее; «++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 100 нМ и менее или равной 500 нМ; «+++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 500 нМ и менее или равной 1000 нМ; и «++++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 1000 нМ и менее или равной 10000 нМ.

[000217] В приведенных ниже примерах и фигурах, предусмотренных в данном документе, «соединение 2» относится к соединению из примера 2, описанному выше.

**Пример 32. Анализ пролиферации клеток CCRF-CEM с применением ASNазы, фенотипический анализ клеточного ингибирования GCN2.**

[000218] Лейкозные клетки CCRF-CEM (№ по каталогу CCL-116) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сывороткой (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения одного миллиона клеток на мл, после чего их пересевали или собирали для применения в анализе. Десять тысяч клеток на лунку в 200 мкл RPMI-1640,

дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сывороткой и 1% пенициллина/стрептомицина, распределяли в 96-луночный планшет с черными стенками и прозрачным дном. Добавляли серийное разведение тестового соединения и 1 мЕд/мл ASNазы в трех повторностях и инкубировали планшеты в течение 72 ч. при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. По окончании инкубирования в каждую лунку планшета добавляли по 40 мкл 440 мМ раствора резазурина (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури) в PBS и инкубировали планшеты еще 6 часов при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95%. Планшеты считывали на устройстве для считывания Synergy2 (Biotek, Уинуски, штат Вермонт) или эквивалентном устройстве с применением возбуждения при 540 нм и испускания при 600 нм. Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом значений IC<sub>50</sub>.

**Пример 33. Анализ фосфо-GCN2 и ATF4 в HCT116 при аминокислотном голодании (-AA)**

[000219] Клетки колоректального рака HCT116 (№ по каталогу CCL-247) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Вкратце, клетки выращивали в среде RPMI 1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сывороткой (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения конfluenceности 70-95%, после чего их пересеивали или собирали для применения в анализе. Клетки высевали в 12-луночный культуральный планшет при пятистах тысячах клеток на лунку в 1 мл полной среды для роста и инкубировали в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. На следующий день в каждой лунке проводили замену на 1 мл сбалансированного солевого раствора Эрла (EBSS, Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), дополненного 10% диализированной эмбриональной бычьей сывороткой, 5,5 мМ глюкозы, 1% пенициллина/стрептомицина и 1% раствора витаминов (Thermo № 11120052). Серийное разведение тестового соединения распределяли в лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч. при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. По окончании инкубирования клетки промывали с помощью PBS, дополненного 1X ингибитором протеаз Halt, 1X ингибитором фосфатаз Halt, 1X смесью ингибиторов фосфатаз 2 Sigma и 1X ЭДТК и затем лизировали с помощью реагента для экстракции белков млекопитающих M-PER, дополненного 3X смеси ингибиторов, описанной выше. Клеточные лизаты подвергали воздействию ультразвука с применением ультразвукового прибора на водяной бане (Qsonica, Ньютаун, штат Коннектикут) и супернатанты кипятили с буфером SDS и восстановителем. Проводили вестерн-блоттинг в отношении каждого лизата для подсчета фосфо-GCN2 (Thr899), общего GCN2, ATF4 и бета-актина. Мембраны подвергали визуализации с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска). Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом значений IC<sub>50</sub>.

**Пример 34. Твердофазный ИФА в отношении ATF4 с применением TG в**

### CCRF-CEM, фенотипический анализ в отношении клеточного ингибирования PERK, предварительно активированных тапсигаргином (TG)

[000220] Лейкозные клетки CCRF-CEM (№ по каталогу CCL-116) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Вкратце, клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сывороткой (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения одного миллиона клеток на мл, после чего их пересевали или собирали для применения в анализе. Один миллион пятьсот тысяч клеток на лунку в 1 мл полной среды для роста распределяли в 12-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. Добавляли серийное разведение тестового соединения и инкубировали клетки при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% в течение трех часов, затем добавляли 1 мкМ тапсигаргина и инкубировали клетки еще один час при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95%. Клетки лизировали, затем измеряли уровни ATF4 с применением твердофазного анализа ИФА (Proteintech, Роузмонт, штат Иллинойс). Уровень поглощения измеряли при 450 нм и 544 нм с применением Synergy2 или эквивалентного ридера (Biotek, Уинуски, штат Вермонт). Данные анализировали с применением программного обеспечения PRISM (Graphpad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом значений IC<sub>50</sub>.

**Таблица 2. Подавление пролиферации клеток CCRF-CEM, обработанных ASNазой, фосфо-GCN2 и ATF4 в НСТ116 в условиях аминокислотного голодания и уровень ATF4 в стимулированных тапсигаргином клетках CCRF-CEM с применением иллюстративных соединений.**

№ примера	Пролиферация клеток CCRF-CEM с ASNазой	Вестерн-блоттинг НСТ116 -AA pGCN2	Вестерн-блоттинг НСТ116 -AA ATF4	Твердофазный ИФА ATF4 с тапсигаргином в CCRF-CEM
1	++			++
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+			+
5	++++			++
6	+++			++
7	+++			++
8	+			+
9	++			+
10	+			+
11	+++			++++

12	++++			++++
13	++			++
14	++			++
15	++			+++
16	+++			++
17	+			+
18	++++			++++
19	++			+
20	++			++
21	++			++
22	++++			++
23	+++			++
24	++++			++
25	++			+
26	++			+
27	+			+
29	++++			++
30	++++			+++
31	+			+
32	+			++
33	+			+

[000221] Для таблицы 2 «+» относится к  $IC_{50}$ , составляющей 100 нМ или менее; «++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 100 нМ и менее или равной 500 нМ; «+++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 500 нМ и менее или равной 1000 нМ; и «++++» относится к  $IC_{50}$ , составляющей более 1000 нМ и менее или равной 10000 нМ.

### **Пример 35. ТВЕРДОФАЗНЫЙ АНАЛИЗ ИФА АТФ4 в Н929**

[000222] Клетки множественной миеломы Н929 (№ по каталогу CRL-9068) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Вкратце, клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 20% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (№ по каталогу A3840002, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (№ по каталогу 10378016, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (№ по каталогу 21985-023, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения одного миллиона пятисот тысяч клеток на мл, после чего их пересеивали или собирали для применения в анализе. Один миллион пятисот тысяч клеток на лунку в 1 мл

полной среды для роста распределяли в 12-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. Добавляли серийное разведение тестового соединения и инкубировали клетки при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% в течение четырех часов. Клетки лизировали, затем измеряли уровни ATF4 с применением твердофазного анализа ИФА (Proteintech, Роузмонт, штат Иллинойс). Уровень поглощения измеряли при 450 нм и 544 нм с применением Synergy2 или эквивалентного ридера (Biotek, Уинуски, штат Вермонт). Данные анализировали с применением программного обеспечения PRISM (Graphpad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом кратности стимуляции клеточного ATF4 относительно обработанного средой-носителем контроля.

**Таблица 3. Стимуляция ATF4 в клетках множественной миеломы H929 с применением иллюстративных соединений.**

№ примера	Твердофазный ИФА ATF4 NS H929
1	++++
2	+++
3	++++
4	+++
5	++
8	+++
9	++++
10	+++
14	++
17	+++
21	++
24	++
25	+++
26	+++

[000223] Для таблицы 3 «+» относится к стимуляции ATF4, являющейся 5-кратной или менее; «++» относится к стимуляции ATF4, являющейся более чем 5-кратной и 10-кратной или менее; «+++» относится к стимуляции ATF4, являющейся более чем 10-кратной и 20-кратной или менее.

[000224] На фиг. 1 представлено графическое изображение, демонстрирующее неожиданную стимуляцию маркера UPR/ISR ATF4 (черные столбики) в ответ на возрастающие концентрации соединения 2. Стимуляция происходила колоколообразно, где уровни ATF4, как было обнаружено, достигали пика при концентрациях в диапазоне от 4 до 123 нМ, в указанном диапазоне концентраций 50% или менее молекул PERK были заняты соединением 2, за ним следовала ингибирующая фаза, где экспрессия ATF4 возвращалась к исходным уровням при концентрациях, которые больше или

эквивалентны 370 нМ соединения 2. Максимальная стимуляция сигнала ATF4 была 13-кратной и происходила при около 41 нМ соединения 2.

**Пример 36. Обнаружение олигомеризации PERK с применением NanoBRET**

[000225] Конструкции для BRET создавали с применением стартерной системы NanoBRET™ Flexi® PPI (Promega, Мадисон, штат Висконсин). Полноразмерную ORF PERK получали от Genscript (Пискатауэй, штат Нью-Джерси). Клетки HEK-293 (№ по каталогу CRL-1573) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде MEM, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Для анализов BRET клетки высевали при плотности 40000 клеток/мл в культуральной среде в 6-луночные планшеты и оставляли для прикрепления и восстановления. Клетки трансфицировали с помощью меченного NLuc на С-конце PERK и меченного галогеном на С-конце PERK с применением липофектамина LTX (Thermo, Уолтем, штат Массачусетс) и оставляли для экспрессии белков на ночь при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки затем отделяли от культуральных чашек с применением 0,05% трипсин-ЭДТА, собирали и разбавляли в аналитической среде, состоящей из восстановленной сывороточной среды Opti-MEM® I, дополненной 4% FBS (Thermo), до 22000 клеток/мл. Клетки распределяли в 96-луночные планшеты для клеточных культур и добавляли лиганд HaloTag® NanoBRET™ 618 (Promega) до конечной концентрации 100 нМ. К клеткам добавляли соединение или ДМСО и инкубировали планшеты в течение 4 ч. при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. К клеткам добавляли субстрат NanoBRET™ Nano-Glo® и встряхивали клетки в течение 30 с. Измеряли значения испускания донора (460 нм) и акцептора (618) на многорежимном устройстве для считывания Synergy Neo2 (BioTek, Уинуски, штат Вермонт) в течение 10 мин добавления субстрата. Данные регистрировали в виде соотношения BRET (акцептор/донор).

[000226] Соединение 2 демонстрировало неожиданную стимуляцию образования олигомеров PERK при EC<sub>50</sub>, составляющей 1,6 нМ. График стимуляции образования олигомеров PERK, индуцированного соединением 2, показан на фигуре 2.

**Пример 37. Стимуляция белков ATF4 и CHOP сигнального пути UPR/ISR при множественной миеломе**

[000227] Клетки множественной миеломы H929 (№ по каталогу CRL-9068) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния), выращивали в RPMI 1640, дополненной 20% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности и поддерживали при 1-2 миллиона клеток на мл. Клетки высевали в 6-луночные планшеты при 4 миллионах клеток на лунку в 2 мл полной среды для роста и обрабатывали с помощью серийного разведения тестовых соединений в течение 4 ч. при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. По окончании инкубирования клетки промывали с

помощью PBS, дополненного 1X ингибитором протеаз Halt, 1X ингибитором фосфатаз Halt, 1X смесью ингибиторов фосфатаз 2 Sigma и 1X ЭДТК и затем лизировали с помощью реагента для экстракции белков млекопитающих M-PER, дополненного 3X смеси ингибиторов, описанной выше. Клеточные лизаты подвергали воздействию ультразвука с применением ультразвукового прибора на водяной бане (Qsonica, Ньютаун, штат Коннектикут) и супернатанты кипятили с буфером SDS и восстановителем. Проводили вестерн-блоттинг для подсчета ATF4, CHOP и бета-актина (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс). Мембраны подвергали визуализации с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска).

[000228] Соединение 2 демонстрировало неожиданную стимуляцию пути UPR/ISR в клетках множественной миеломы H929. Графическое изображение стимуляции последующих сигнальных белков ATF4 и CHOP PERK (актин в качестве контроля нагрузки) представлено на фиг. 3. ATF4 стимулируется в диапазоне концентраций от 4,5 нМ до 123 нМ. CHOP стимулируется в диапазоне концентраций от 4,5 нМ до 41 нМ.

**Пример 38. Стимуляция целевых генов UPR/ISR при множественной миеломе с применением количественной ОТ-ПЦР**

[000229] Клетки множественной миеломы H929 множественной миеломы (№ по каталогу CRL-9068) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 20% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (№ по каталогу A3840002, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (№ по каталогу 10378016, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (№ по каталогу 21985-023, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения конfluenceности 70-95%, после чего их пересевали или собирали для применения в анализе. Клетки высевали в 6-луночный культуральный планшет при 3,0×10<sup>6</sup> клеток на лунку в 2 мл полной среды для роста и инкубировали с указанными концентрациями соединения 2 при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности в течение 4 ч. По окончании инкубирования клетки промывали с помощью PBS (Sigma) и экстрагировали РНК с применением наборов RNeasy<sup>®</sup> Plus (Qiagen, Джермантаун, штат Мэриленд). Синтезировали кДНК с применением набора для обратной транскрипции кДНК высокой производительности (Applied Biosciences, Беверли-Хиллз, штат Калифорния) и проводили количественную ПЦР на QuantStudio 3 (Applied Biosciences) с применением анализов TaqMan (таблица 1, Thermo) и TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo) в соответствии с инструкциями производителя.

<b>Таблица: Зонды TaqMan</b>	
<b>Ген, представляющий интерес</b>	<b>ID анализа</b>
ATF4	Hs00909569_g1

DDIT3 (CHOP)	Hs00358796_g1
GPT2	Hs00370287_m1
GUSB (эндогенный контроль)	Hs00939627_m1
PPP1R15A (GADD34)	Hs00169585_m1
VEGFA	Hs00900055_m1

[000230] Соединение 2 неожиданно индуцировало экспрессию генов-мишеней UPR/ISR в клетках множественной миеломы H929. Данные представлены как кратное изменение по сравнению с образцом, обработанным контролем со средой-носителем (ДМСО). На фиг. 4 представлено собой графическое изображение, демонстрирующее стимуляцию генов-мишеней ATF4 в ответ на возрастающие концентрации соединения 2 (черные столбики - с ДМСО, темно-серые столбики - с 1,5 нМ, столбики в шахматную клетку - 14 нМ, столбики в полоску - 41 нМ, светло-серые столбики - 123 нМ и столбики с точками - 370 нМ). Транскрипционная активация генов-мишеней ATF4 происходила колоколообразно. Максимальная стимуляция для ATF4 в моменты времени 4 ч. составляла ~3 раза; максимальная стимуляция для CHOP в момент времени 4 ч. составляла ~10 раз; максимальная стимуляция для GADD34 в момент времени 4 ч. составляла ~3 раза; максимальная стимуляция для GPT2 в момент времени 4 ч. составляла ~3; максимальная стимуляция для VEGFA в момент времени 4 ч. составляла ~2 раза. Стимуляция генов-мишеней ATF4 происходила колоколообразно, при этом было обнаружено, что уровни достигали пика при концентрациях в диапазоне от 14 до 123 нМ, в указанном диапазоне концентраций 50% или менее молекул PERK были заняты соединением 2, за ним следовала ингибирующая фаза, где экспрессия возвращалась к исходным уровням при концентрациях, которые больше или эквивалентны 370 нМ соединения 2.

### **Пример 39. Стимуляция апоптотического сигнального пути при множественной миеломе**

[000231] Клетки множественной миеломы H929 (№ по каталогу CRL-9068) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния), выращивали в RPMI 1640, дополненной 20% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности и поддерживали при 1-2 миллиона клеток на мл. Клетки высевали в 6-луночные планшеты при 4 миллионах клеток на лунку в 2 мл полной среды для роста и обрабатывали с помощью серийного разведения тестовых соединений в течение 24 ч. при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. По окончании инкубирования клетки промывали с помощью PBS, дополненного 1X ингибитором протеаз Halt, 1X ингибитором фосфатаз Halt, 1X смесью ингибиторов фосфатаз 2 Sigma и 1X ЭДТК и затем лизировали с помощью реагента для экстракции белков млекопитающих M-PER, дополненного 3X смеси ингибиторов, описанной выше. Клеточные лизаты подвергали воздействию

ультразвука с применением ультразвукового прибора на водяной бане (Qsonica, Ньютаун, штат Коннектикут) и супернатанты кипятили с буфером SDS и восстановителем. Проводили вестерн-блоттинг для подсчета расщепленной каспазы 3, расщепленной каспазы 7, PARP и бета-актина (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс). Мембраны подвергали визуализации с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска).

[000232] Соединение 2 неожиданно индуцировало экспрессию проапоптотических белков в клетках множественной миеломы H929. Обработка клеток соединением 2 приводила к повышению уровней расщепленного PARP, расщепленной каспазы-7 и расщепленной каспазы-3. Стимуляция указанных апоптотических показателей происходила колоколообразно и достигала пика при концентрациях в диапазоне от 4,5 нМ до 41 нМ.

**Пример 40. Подавление пролиферации клеток множественной миеломы и В-клеточной лимфомы**

[000233] Клетки H929, RPMI8226, GA-10 и DoHH-2 (№ по каталогу CRL-9068) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки H929 поддерживали в среде RPMI-1640, дополненной 20% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (№ по каталогу A3840002, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (№ по каталогу 10378016, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (№ по каталогу 21985-023, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). RPMI8226, GA-10, DoHH-2 поддерживали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (№ по каталогу A3840002, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (№ по каталогу 10378016, ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Все клетки выращивали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки размножали до достижения одного миллиона пятисот тысяч клеток на мл, после чего их пересеивали или собирали для применения в анализе.

[000234] Для анализа клеточной пролиферации соответствующее количество клеток (сорок тысяч клеток для H929; двадцать тысяч клеток для RPMI8226 и GA-10; восемь тысяч клеток для DoHH-2) высевали на лунку в 200 мкл в соответствующей среде, распределяли в 96-луночный планшет с черными стенками и прозрачным дном. Добавляли серийное разведение тестового соединения в трех повторностях и инкубировали планшеты в течение 72 или 120 ч при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Использовали несколько стандартных средств лечения для исследований комбинаций (леналидомид (№ по каталогу S1029, Selleckchem, Хьюстон, штат Техас), бортезомиб (№ по каталогу S1013, Selleckchem, Хьюстон, штат Техас), дексаметазон (№ по каталогу S1322, Selleckchem, Хьюстон, штат Техас), ибрутиниб (Pharmacocyclics, Саннивейл, штат Калифорния)). По окончании инкубирования в случае H929, RPMI8226 и GA-10 в каждую лунку планшета добавляли по 40 мкл 440 мМ раствора резазурина (Sigma, Сент-Луис,

штат Миссури) в PBS и инкубировали планшеты еще 7 часов при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95%. Планшеты считывали на устройстве для считывания Synergy2 (Biotek, Уинуски, штат Вермонт) или эквивалентном устройстве с применением возбуждения при 540 нм и испускания при 600 нм. По окончании инкубирования DoHH-2 определяли жизнеспособность клеток с применением анализа CellTiter-Glo® (Promega, Мадисон, штат Висконсин). Люминесценцию измеряли с применением ридера EnVision с несколькими режимами (PerkinElmer, Уолтем, штат Массачусетс). Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом значений IC<sub>50</sub>.

[000235] Соединение 2 в комбинации со стандартными средствами лечения (SOC), которыми лечат множественную миелому или В-клеточные лимфомы, проявляет аддитивный или синергетический эффект в отношении подавления клеточной пролиферации. Иллюстративные графики показаны на фиг. 6A, 6B, 6C и 6D. На фиг. 6A представлен эксперимент по пролиферации клеток множественной миеломы RPMI8226, обработанных титром соединения 2 с 333 нМ дексаметазона (серые ромбики) или без него (черные кружки) в течение 96 ч. Комбинированная обработка приводила к ингибированию пролиферации клеток с IC<sub>50</sub>, составляющей 7 нМ. На фиг. 6B представлен эксперимент по пролиферации клеток множественной миеломы H929, обработанных титром соединения 2 с 3 нМ бортезомиба (серые квадраты) или без него (черные кружки) в течение 96 ч. Комбинированная обработка приводила к ингибированию пролиферации клеток с IC<sub>50</sub>, составляющей 6 нМ. На фиг. 6C представлен эксперимент по пролиферации клеток лимфомы Беркитта GA-10, обработанных титром соединения 2 с 50 нМ дексаметазона (серые треугольники) или без него (черные кружки) в течение 96 ч. Комбинированная обработка приводила к ингибированию пролиферации клеток с IC<sub>50</sub>, составляющей 4 нМ. На фиг. 6D представлен эксперимент по пролиферации клеток фолликулярной лимфомы, обработанных титром соединения 2 с 41 нМ ибрутиниба (серые звездочки) или без него (черные кружки) в течение 96 ч. Комбинированная обработка приводила к ингибированию пролиферации клеток с IC<sub>50</sub>, составляющей 4 нМ.

**Пример 41. Фармакокинетические/фармакодинамические (PK/PD) исследования в ксенотрансплантатной модели CCRF-CEM**

[000236] Ксенотрансплантатную модель CCRF-CEM реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (NIH) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для Labcorp (Энн-Арбор, штат Мичиган), лаборатории, аккредитованной AAALAC. Пищу и воду предоставляли в свободном доступе. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам мышей Envigo C.B-17 SCID (в возрасте 6-7 недель) инокулировали подкожно сразу ниже правой верхней части подмышечной впадины десять миллионов клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с применением иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали

200 мм<sup>3</sup> в среднем на день 22, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы подвергали воздействию в дни 23-24 следующим образом: в день 23 контрольная среда-носитель (вводили дозу перорально и IP для имитации группы комбинации) (n=9); вводили дозу ASНазы (Abcam, Кембридж, Великобритания) IP при 1000 ед/кг/день (n=9). В день 24 вводили дозу контрольной среды-носителя (вводили дозу перорально и IP для имитации группы комбинации) (n=9); вводили дозу соединения 2 перорально при 50 мг/кг/сутки соединения 2 (n=9) и вводили дозу ASНазы (Abcam, Кембридж, Великобритания) IP при 1000 Ед/кг/сутки (n=9) за 2 ч. до сбора образцов; вводили дозу соединения 2 перорально при 25 мг/кг/сутки соединения 2 (n=9) и вводили дозу ASНазы (Abcam, Кембридж, Великобритания) IP при 1000 Ед/кг/сутки (n=9) за 2 ч. до сбора образцов через 2, 6 и 10 ч. после введения дозы соединения 2. Образцы крови собирали в пробирки с К2ЭДТА и перерабатывали в плазму крови, мгновенно замораживали в жидком азоте, затем хранили при -80 °С. Образцы плазмы крови подвергали фармакокинетическому анализу с применением анализа жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (Cayman Chemical, Энн-Арбор, штат Мичиган). Опухоли и ткани поджелудочной железы собирали и растирали в порошок над жидким азотом в пакетах Covaris и хранили при -80 °С. Образец ткани, представляющий собой обработанные примерно 30 мг опухоли или ткани поджелудочной железы, лизировали в буфере для лизирования mPER (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), дополненном 3X ингибитором протеаз Halt, 3X ингибитором фосфатаз Halt, 3X смесью ингибиторов фосфатаз Sigma 2 и 3X ЭДТК на льду, затем гомогенизировали с применением Bead Ruptor 96 (Omni, Кеннесо, штат Джорджия). Образцы затем центрифугировали при 21000 g в течение 10 мин при 4 °С. Очищенные лизаты затем переносили в охлажденные на льду 96-луночные планшеты с коническим дном лунок, запечатывали, затем хранили при -80 °С. На следующий день образцы оттаивали на льду с последующим центрифугированием при 3739 g в течение 10 мин. при 4°С. Очищенные лизаты затем переносили в охлажденные на льду 96-луночные планшеты с круглым дном лунок. Концентрации белков определяли с применением набора для анализа белков BCA (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Лизаты нормализовали до 10 мкг/мкл перед кипячением в 4X буфере для образцов SDS и восстановителе. Образцы разделяли с применением SDS-PAGE, затем анализировали с применением вестерн-блоттинга для количественного определения фосфо-GCN2 (Thr899) (Abcam, Кембридж, Великобритания), общего GCN2, ATF4 и бета-актина (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс). Мембраны визуализировали с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска). Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом % ингибирования.

[000237] Соединение 2 в комбинации с ASНазой ингибирует GCN2-опосредованные уровни ATF4 в ксенотрансплантатной модели лейкоза CCRF-CEM. Как

показано на фиг. 7, соединение 2 ингибировало уровни ATF4 на 87-91% по сравнению с контрольной средой-носителем при введении дозы 50 мг/кг перорально и ингибировало уровни ATF4 на 57%-93% по сравнению с контрольной средой-носителем при введении дозы 25 мг/кг перорально. Соответствующие уровни соединения 2 в плазме крови определяли при РД в моменты времени 2, 6 и 10 часов после введения дозы.

#### **Пример 42. Эффективность в ксенотрансплантатной модели MV-4-11**

[000238] Ксенотрансплантатную модель MV-4-11 реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (НИИ) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для Crown Bioscience (Тайцан, Китай), лаборатории, аккредитованной AAALAC. Пищу и воду предоставляли в свободном доступе. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам NOD/SCID (в возрасте 6-9 недель; Vital River Laboratories Research Models and Services (Пекин, Китай)) подкожно инокулировали в правую переднюю боковую область пять миллионов клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко:матригель (1:1) с помощью иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали 150 мм<sup>3</sup> в среднем на день 7, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы подвергали воздействию в дни 7-21 следующим образом: контрольная среда-носитель (вводили дозу перорально и IP для имитации группы комбинации (n=10); вводили дозу соединения 2 перорально при 50 мг/кг/сутки (n=10); вводили дозу лейназы (Kyowa Kirin, Япония) IP при 1000 Ед/кг/сутки (n=10); вводили дозу лейназы (Kyowa Kirin, Япония) IP при 1000 Ед/кг/день (n=10) и вводили дозу соединения 2 перорально при 50 мг/кг/сутки соединения 2 (n=10). Объем опухоли и массу тела измеряли три раза в неделю. Опухолевую нагрузку (мг) оценивали по данным измерений штангенциркулем по формуле: опухолевая нагрузка (мг=мм<sup>3</sup>)=(длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

[000239] Соединение 2 в комбинации с ASНазой подавляет рост опухоли MV-4-11 при введении дозы перорально. Как показано на фиг. 8, после 14 дней введения соединения 2 в дозе 50 мг/кг/сутки в качестве единственного агента не наблюдали значительного эффекта в отношении роста опухоли. При введении 50 мг/кг/сутки соединения 2 в комбинации с лейназой среднее ингибирование роста опухоли составляло 54% после 14 дней введения дозы.

#### **Пример 43. Анализ активации рекомбинантного GCN2**

[000240] Рекомбинантный GCN2(EIF2AK4) (Carna Biosciences, Япония) дефосфорилировали путем инкубирования с 16000 единицами лямбда-фосфатазы (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс) в течение 3 ч. при 30°C в 1X фосфатазном реакционном буфере. Для измерения опосредованной соединением 2 модуляции GCN2 инкубировали 12,5 нМ дефосфорилированного GCN2, разбавленного в буфере для киназы

(Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), с титром соединения 2 в течение 30 мин. при к. т. После инкубации к смеси добавляли 130 нМ субстрата (GFP-eIF2a) (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 0,05 мМ АТФ и инкубировали в течение 60 мин при к. т. Реакцию останавливали путем добавления 10 мМ ЭДТК и детектировали фосфорилированный субстрат eIF2a с применением 2 нМ антитела LanthaScreen Tb-anti-peIF2a (pSer52) (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), затем инкубировали в темноте. Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре контролировали TR-FRET с применением длины волны возбуждения 340 нМ и значений длины волны испускания 490 нм и 520 нм.

[000241] На фиг. 9А, при концентрациях в диапазоне 0,05-3 нМ, соединение 2 неожиданно активировало фермент GCN2 до 250% от контроля. При концентрациях выше 10 нМ соединение 2 ингибировало активность рекомбинантного фермента GCN2 *in vitro*.

#### **Пример 44. Анализ активации рекомбинантного PERK**

[000242] Для измерения опосредованной соединением 2 модуляции PERK инкубировали 200 нМ фермента PERK (Enzo, Фармингдейл, штат Нью-Йорк) с титром соединения 2 в течение 30 мин при к. т. После инкубации к смеси добавляли 200 нМ субстрата (GFP-eIF2a) (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и 1 мМ АТФ и инкубировали в течение 60 мин при к. т. Реакцию останавливали путем добавления 10 мМ ЭДТК и детектировали фосфорилированный субстрат eIF2a с применением 2 нМ антитела LanthaScreen Tb-anti-peIF2a (pSer52) (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), затем инкубировали в темноте. Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре контролировали TR-FRET с применением длины волны возбуждения 340 нМ и значений длины волны испускания 490 нм и 520 нм.

[000243] На фиг. 9В, при концентрациях в диапазоне 0,05-6 нМ, соединение 2 неожиданно активировало фермент PERK до 250% от контроля. При концентрациях выше 3 мкМ соединение 2 ингибировало активность рекомбинантного фермента PERK *in vitro*.

#### **Пример 45. Вестерн-блоттинг сфероидов**

[000244] Клеточные линии NSCLC H358 (№ по каталогу CRL-5807) и H2030 (№ по каталогу CRL-5914) и клеточную линию фибросаркомы HT-1080 (№ по каталогу CRL-5807) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности и выдерживали при конfluence 50-80% до использования. Клетки высевали при 500000 клеток/лунка в 24-луночные планшеты Elplasia (Corning, Глендейл, штат Аризона) с полной питательной средой при 1 мл/лунка и инкубировали в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности с получением сфероидов. На следующий день получали серийные разведения тестируемых соединений в полной питательной среде и удаляли 500 мкл существующей среды из каждой лунки, и заменяли свежей средой, содержащей титры соединений. Затем инкубировали сфероиды с тестируемыми

соединениями в течение 4 часов или 24 часов в тех же условиях. По окончании инкубирования сфероида промывали с помощью PBS, дополненного 1X ингибитором протеаз Halt, 1X ингибитором фосфатаз Halt (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), 1X смесью ингибиторов фосфатаз 2 (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури) и 1X ЭДТК (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и затем лизировали с помощью реагента для экстракции белков млекопитающих M-PER, дополненного 3X смеси ингибиторов, описанной выше. Клеточные лизаты подвергали воздействию ультразвука с применением ультразвукового прибора на водяной бане (Qsonica, Ньютаун, штат Коннектикут) и супернатанты кипятили с буфером SDS и восстановителем. Выполняли вестерн-блоттинг для количественного определения фосфо-GCN2 (R&D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота), ATF4, CHOP, расщепленного PARP, расщепленной каспазы 3 и 7 и бета-актина (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс). Мембраны подвергали визуализации с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска).

[000245] На фиг. 10А, 10В и 10С показано, что соединение 2 неожиданно демонстрировало стимуляцию ISR и пути апоптоза в клеточных линиях рака с солидными опухолями (фиг. 10А, H2030; фиг. 10В, H358; фиг. 10С, HT-1080). Изображение вестерн-блоттинга фосфорилирования активированного GCN2 (pGCN2) и нисходящего сигнального белка ATF4 и маркеров пути проапоптоза (расщепленного PARP1, расщепленной каспазы 3/7) (актин в качестве контроля нагрузки) показано на фиг. 10А, 10В и 10С. Уровни pGCN2 повышались в линиях клеток H2030 и H358, а уровни ATF4, с-PARP и с-каспазы 7 повышались в диапазоне концентраций от 4,6 нМ до 300 нМ. Количественное определение сигнала ATF4 с помощью вестерн-блоттинга представлено в формате столбчатой диаграммы. Соединение 2 повышало уровень ATF4 до 20 раз в сфероиде H2030, до 12 раз в сфероиде H358 и до 15 раз в сфероиде HT-1080.

#### **Пример 46. Анализ пролиферации сфероидов**

[000246] Клеточные линии немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) H358 (№ по каталогу CRL-5807) и H2030 (№ по каталогу CRL-5914) и линию фибросаркомы HT-1080 (№ по каталогу CRL-5807) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности и выдерживали при конfluence 50-80% до использования. Высеивали 500-1000 клеток в 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением (Corning, Глендейл, штат Аризона) с полной питательной средой при 80 мкл/луночка и инкубировали в течение ночи при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95% с получением сфероидов. На следующий день получали серийные разведения тестируемых соединений в полной питательной среде и добавляли в сфероиды 20 мкл на луночку среды, содержащей титры соединений, в трех повторностях. Затем инкубировали сфероиды с тестируемыми соединениями в течение 5 дней в тех же условиях. По окончании инкубации сфероиды

лизируют с помощью 100 мкл/лунка реагента для анализа жизнеспособности CellTiter-Glo 3D (Promega, Мэдисон, штат Висконсин) и определяют люминесценцию с применением Synergy2 или эквивалентного считывающего устройства (Biotek, Уинуски, штат Вермонт). Данные анализируют с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом значений  $IC_{50}$ .

[000247] На фиг. 11А, 11В и 11С соединение 2 индуцировало 50% регрессию клеток в сфероидов солидной опухоли H2030 в качестве единственного агента (фиг. 11А). Соединение 2 ингибировало клеточную пролиферацию сфероидов солидной опухоли H358 ( $IC_{50}$  10 нМ, фиг. 11В) и HT-1080 ( $IC_{50}$  12 нМ, фиг. 11С) в качестве единственного агента.

[000248] На фиг. 12А, 12В и 12С соединение 2 в комбинации со стандартными средствами лечения (SOC) проявляло аддитивность или синергизм в отношении ингибирования роста сфероидов. Иллюстративные графики показаны на фиг. 12А, 12В и 12С. На фиг. 12А представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероидов NSCLC H2030, обработанных титром соединения 2 в комбинации с 3,3 нМ соторасиба (ромбики) или без соторасиба (кружки) в течение 96 часов. На фиг. 12В представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероидов NSCLC H358, обработанных титром соединения 2 в комбинации с 3,3 нМ соторасиба (ромбики) или без соторасиба (кружки) в течение 96 часов. На фиг. 12С представлен эксперимент по клеточной пролиферации в сфероидов NSCLC H2030, обработанных титром соединения 2 в комбинации с 3,7 нМ траметиниба (треугольники) или без траметиниба (кружки) в течение 96 часов. Во всех трех экспериментах комбинированная обработка приводила к большей регрессии сфероидов по сравнению с любым единственным агентом.

#### **Пример 47. Анализ нокдауна кшРНК HT-1080**

[000249] Клеточную линию фибросаркомы HT-1080 (№ по каталогу CRL-5807) получали из Американской коллекции типовых культур (АТТС, Манассас, штат Виргиния). Клетки выращивали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сывороткой и 1% пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) при 37 °С, 5%  $CO_2$  и 95% влажности и поддерживали при конфлюентности 50-80% до использования. Конструкты, экспрессирующие кшРНК, нацеленные на PERK, GCN2 или скремблированный контроль, получали из MISSION (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури) и своими силами получали лентивирусы, содержащие каждый конструкт. Клетки высевали при 400000 клеток/лунка в 6-луночные планшеты для культивирования тканей (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с полной питательной средой и инкубировали в течение ночи при 37 °С, 5%  $CO_2$  и 95% влажности для прикрепления. На следующий день из каждой лунки удаляли существующую среду и пополняли свежей средой в количестве 1 мл/лунка, содержащей 5 мкг/мл полибрена (VectorBuilder, Чикаго, штат Иллинойс). Клетки трансдуцировали с помощью 200 мкл/лунка соответствующего лентивируса в течение 24 часов, затем обрабатывали для вестерн-блоттинга и анализов

пролиферации клеток.

[000250] На фиг. 13А общий GCN2 подвержен нокауту на 57% с применением нацеливающих кшРНК в клеточной линии HT-1080. PERK подвержен нокауту на 65% с применением нацеливающих кшРНК в клеточной линии HT-1080. Повышенная регуляция маркеров ISR (ATF4, pEIF2a и CHOP), опосредованная соединением 2, была подавлена при нокауте GCN2 или PERK. Фиг. 13В представляет собой количественное определение сигнала ATF4 с помощью вестерн-блоттинга. Повышенная регуляция ATF4, опосредованная соединением 2, была снижена на 75% при нокауте GCN2. Повышенная регуляция ATF4, опосредованная соединением 2, была снижена на 50% при нокауте PERK. На фиг. 13С, опосредованное соединением 2 ингибирование роста сфероидов было ослаблено при нокауте GCN2, но не PERK в указанной линии клеток солидной опухоли.

**Пример 48. Фармакокинетические/фармакодинамические (PK/PD) исследования в ксенотрансплантатной модели HT-1080**

[000251] Ксенотрансплантатную модель HT-1080 реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (NIH) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для Labcorp (Энн-Арбор, Мичиган), лаборатории, аккредитованной AAALAC. Пищу и воду предоставляли в свободном доступе. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам бестимусных мышей (в возрасте 6-7 недель) инокулировали подкожно сразу ниже правой верхней части подмышечной впадины два миллиона клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с применением иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали 150 мм<sup>3</sup> в среднем на день 6, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы обрабатывали в дни 6-11 следующим образом: контроль со средой-носителем (вводили перорально) (n=9); соединение 2 вводили перорально в дозе 10 мг/кг BID (n=9); соединение 2 вводили перорально в дозе 5 мг/кг BID; соединение 2 вводили перорально в дозе 1 мг/кг BID (n=9) до сбора образца через 2, 6 и 10 ч. после введения дозы в день 11. Образцы крови собирали в пробирки К2ЭДТА и перерабатывали в плазму крови, мгновенно замораживали в жидком азоте, затем хранили при -80 °С. Образцы плазмы крови подвергали фармакокинетическому анализу с применением анализа жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (Cayman Chemical, Энн-Арбор, штат Мичиган). Опухоли собирали и растирали в порошок над жидким азотом в пакетах Covaris и хранили при -80 °С. Образец ткани, представляющий собой обработанные примерно 30 мг опухоли, лизировали в буфере для лизирования MPER (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), дополненном 3X ингибитором протеаз Halt, 3X ингибитором фосфатаз Halt, 3X смесью ингибиторов фосфатаз Sigma 2 и 3X ЭДТК на льду, затем гомогенизировали с применением Bead Ruptor 96 (Omni, Кеннесо, штат

Джорджия). Образцы затем центрифугировали при 21000 g в течение 10 мин. при 4 °C. Очищенные лизаты затем переносили в охлажденные на льду 96-луночные планшеты с коническим дном лунок, запечатывали, затем хранили при -80 °C. На следующий день образцы оттаивали на льду с последующим центрифугированием при 3739 g в течение 10 мин при 4 °C. Очищенные лизаты затем переносили в охлажденные на льду 96-луночные планшеты с круглым дном лунок. Концентрации белков определяли с применением набора для анализа белков BCA (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Лизаты нормализовали до 10 мкг/мкл перед кипячением в 4X буфере для образцов SDS и восстановителе. Образцы определяли с применением SDS-PAGE, затем анализировали с применением вестерн-блоттинга для количественного определения ATF4 и бета-актина (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс). Мембраны подвергали визуализации с применением системы для визуализации LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, штат Небраска). Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния) с расчетом % ингибирования.

[000252] На фиг. 14 и 14B соединение 2 повышало уровни ATF4 в ксенотрансплантатной модели РК/PD фибросаркомы HT-1080. Как показано на фиг. 14A, соединение 2 повышало уровни ATF4 в 4,5 раза по сравнению с контролем со средой-носителем при введении дозы 10 мг/кг BID перорально, повышало уровни ATF4 в 3,5 раза по сравнению с контролем со средой-носителем при введении дозы 5 мг/кг BID перорально и повышало уровни ATF4 в 3 раза по сравнению с контролем со средой-носителем при введении дозы 1 мг/кг BID перорально. Соответствующие уровни соединения 2 в плазме крови определяли при PD в моменты времени 2, 6 и 10 часов после введения дозы (фиг. 14B).

#### **Пример 49. Эффективность в ксенотрансплантатной модели LoVo**

[000253] Ксенотрансплантатную модель LoVo реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (NIH) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для Crown Bioscience (Тайцан, Китай), лаборатории, аккредитованной AAALAC. Пищу и воду предоставляли в свободном доступе. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам бестимусных мышей Balb/c (в возрасте 5-9 недель) инокулировали подкожно сразу ниже правой верхней части подмышечной впадины десять миллионов клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с применением иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали 100 мм<sup>3</sup> в среднем на день 6, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы обрабатывали в дни 6-27 следующим образом: контроль со средой-носителем (вводили перорально) (n=9); соединение 2 вводили перорально в дозе 5 мг/кг BID (n=9); соединение 2 вводили

перорально в дозе 1 мг/кг ВІD. Объем опухоли и массу тела измеряли три раза в неделю. Опухолевую нагрузку (мг) оценивали по данным измерений штангенциркулем по формуле: опухолевая нагрузка (мг=мм<sup>3</sup>)=(длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

#### **Пример 50. Эффективность в ксенотрансплантатной модели НТ-1080**

[000254] Ксенотрансплантатную модель НТ-1080 реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (НИH) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для Labcorp (Энн-Арбор, Мичиган), лаборатории, аккредитованной АААLАС. Пищу и воду предоставляли в свободном доступе. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам бестимусных мышей (в возрасте 6-7 недель) инокулировали подкожно сразу ниже правой верхней части подмышечной впадины два миллиона клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с применением иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали 100 мм<sup>3</sup> в среднем на день 6, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы обрабатывали в дни 6-14 следующим образом: контроль со средой-носителем (вводили перорально) (n=9); соединение 2 вводили перорально в дозе 10 мг/кг ВІD (n=9); соединение 2 вводили перорально в дозе 5 мг/кг ВІD. Объем опухоли и массу тела измеряли три раза в неделю. Опухолевую нагрузку (мг) оценивали по данным измерений штангенциркулем по формуле: опухолевая нагрузка (мг=мм<sup>3</sup>)=(длина x ширина<sup>2</sup>)/2.

[000255] Как показано на фиг. 15А, соединение 2 ингибировало рост опухоли в ксенотрансплантатной модели колоректального LoVo. Среднее значение подавления роста опухоли составляло 69% через 22 дня после введения дозы соединения 2 при 5 мг/кг ВІD. На фиг. 15В соединение 2 ингибировало рост опухоли в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы НТ-1080. Среднее значение подавления роста опухоли составляло 50% через 14 дней после введения дозы соединения 2 при 10 мг/кг ВІD.

#### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

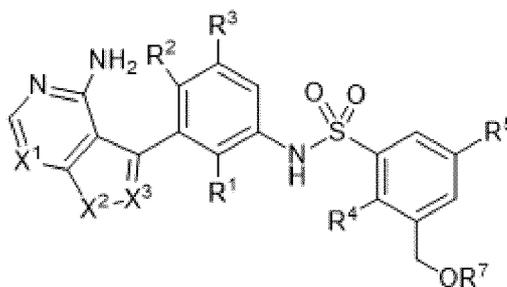
[000256] Несмотря на то, что были рассмотрены конкретные варианты осуществления, представленное выше описание является иллюстративными и неограничивающими. Множество вариаций вариантов осуществления будут ясны специалистам в данной области при прочтении данного описания. Полный объем раскрытого должен быть определен посредством ссылки на формулу изобретения, наряду с ее полным объемом эквивалентов, и описания, наряду с такими вариациями.

[000257] Если не указано иное, все числа, указывающие количества ингредиентов, условия реакций и т. д., применяемые в описании и формуле изобретения, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно». Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, представленные в данном описании, и прилагаемая формула изобретения являются приблизительными и могут

различаться в зависимости от необходимых для получения свойств.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное формулой I-A:



Формула I-A,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где:

каждый из  $X^1$  и  $X^3$  независимо выбран из группы, состоящей из CH и N;

$X^2$  выбран из группы, состоящей из  $NR^6$ , O и S;

каждый из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано и алкокси;

$R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;

$R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и

$R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

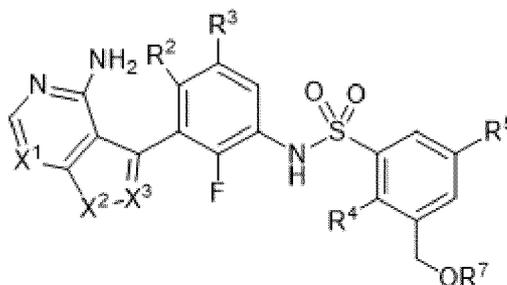
2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что по меньшей мере один из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой галоген.

3. Соединение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что по меньшей мере один из  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой фтор.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой фтор.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что  $X^1$  представляет собой N.

6. Соединение, представленное формулой I-B:



Формула I-B,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где:

каждый из  $X^1$  и  $X^3$  независимо выбран из группы, состоящей из СН и N;  
 $X^2$  выбран из группы, состоящей из  $NR^6$ , O и S;  
 каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано  
 и алкокси;

$R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;

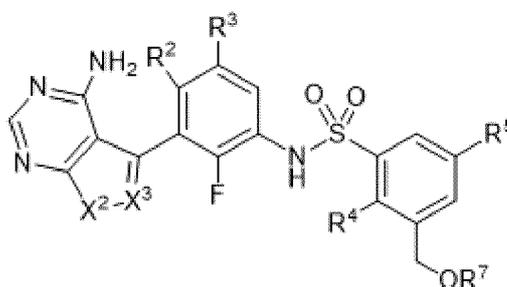
$R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;

$R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и

$R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

7. Соединение по п. 6, отличающееся тем, что  $X^1$  представляет собой N.

8. Соединение, представленное формулой I-C:



Формула I-C,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где:

$X^2$  выбран из группы, состоящей из  $NR^6$ , O и S;

$X^3$  выбран из группы, состоящей из СН и N;

каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано  
 и алкокси;

$R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;

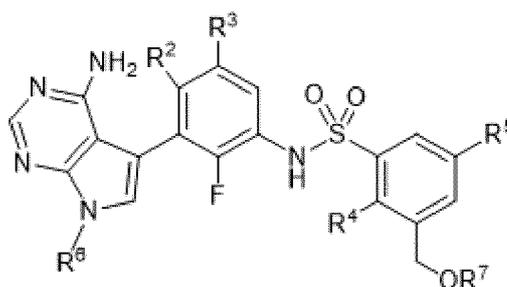
$R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;

$R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и

$R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацила.

9. Соединение по п. 8, отличающееся тем, что  $X^2$  представляет собой  $NR^6$ .

10. Соединение, представленное формулой I-D:



## Формула I-D,

или его фармацевтически приемлемая соль, энантиомер, стереоизомер или таутомер, где:

каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, циано и алкокси;

$R^4$  выбран из группы, состоящей из галогена, алкокси и алкила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из H, галогена и алкила;

$R^6$  выбран из группы, состоящей из H, алкила, алкенила, алкенилалкила, алкинила, алкинилалкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, циклоалкенила, гетероциклила, гетероциклилалкила, арила, гетероарила и гетероарилалкила; и

$R^7$  выбран из группы, состоящей из H, алкила и ацетата.

11. Соединение по любому из пп. 6-10, отличающееся тем, что  $R^2$  представляет собой H, и  $R^3$  представляет собой H.

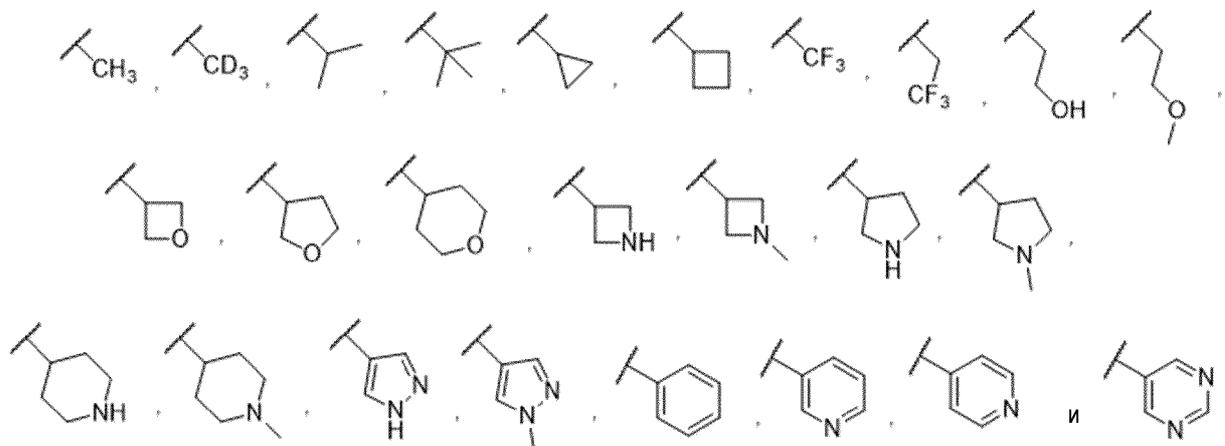
12. Соединение по любому из пп. 6-10, отличающееся тем, что  $R^2$  представляет собой F, и  $R^3$  представляет собой H.

13. Соединение по любому из пп. 6-10, отличающееся тем, что  $R^2$  представляет собой F, и  $R^3$  представляет собой F.

14. Соединение по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что  $R^6$  выбран из группы, состоящей из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)алкокси-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, гетероциклила, гетероциклил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, арила, гетероарила и гетероарил-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила.

15. Соединение по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что  $R^6$  выбран из группы, состоящей из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)алкокси-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, гетероциклила и гетероарила.

16. Соединение по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что  $R^6$  выбран из группы, состоящей из



17. Соединение по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что  $R^4$  выбран из

группы, состоящей из галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила.

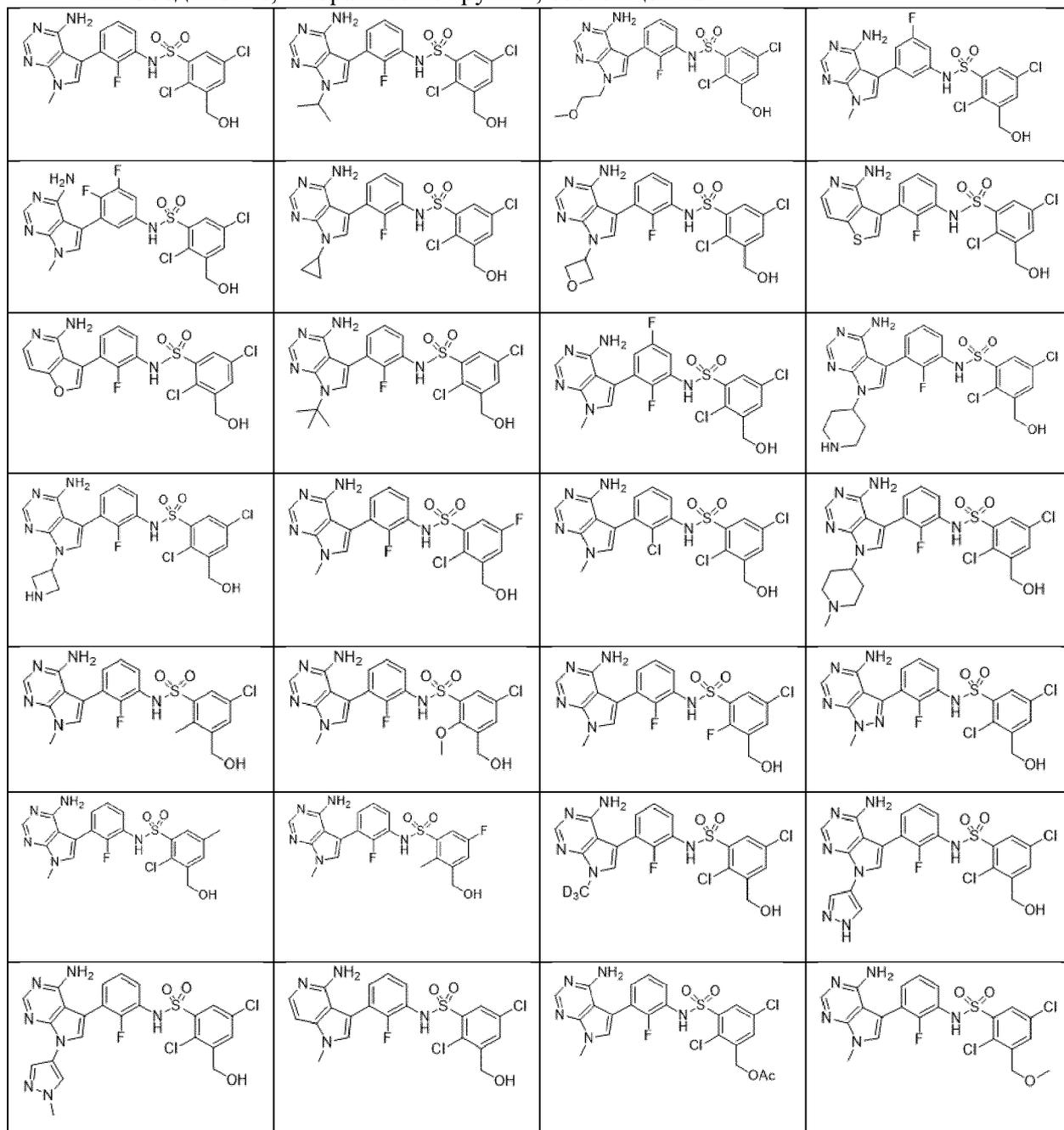
18. Соединение по любому из пп. 1-17, отличающееся тем, что R<sup>4</sup> выбран из группы, состоящей из хлора, фтора, метокси и метила.

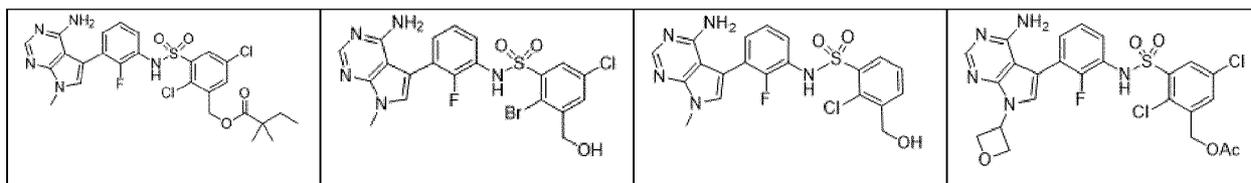
19. Соединение по любому из пп. 1-18, отличающееся тем, что R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из H, галогена и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила.

20. Соединение по любому из пп. 1-19, отличающееся тем, что R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из хлора, фтора и метила.

21. Соединение по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что R<sup>7</sup> представляет собой H.

22. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:





и их фармацевтически приемлемых солей, энантимеров, стереоизомеров и таутомеров.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-22 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

24. Способ лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2.

26. Способ по п. 24 или п. 25, отличающийся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой GCN2.

27. Способ по п. 24 или п. 25, отличающийся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK.

28. Способ модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

29. Способ активации киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

30. Способ модулирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

31. Способ активации киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

32. Способ ингибирования активности киназы GCN2 и ингибирования активности

киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

33. Способ ингибирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

34. Способ ингибирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

35. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, амилоидоза легкой цепи и злокачественной лимфомы.

37. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой лейкоз.

38. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

39. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

40. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

41. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

42. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому.

43. Способ по п. 127 или п. 128, отличающийся тем, что рак представляет собой В-

клеточную лимфому.

44. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

45. Способ лечения амилоидоза у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

46. Способ лечения амилоидоза легкой цепи у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

47. Способ лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п. 23.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2.

49. Способ по п. 47, отличающийся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK.

50. Способ по любому из пп. 47-49, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы.

52. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой лейкоз.

53. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

54. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой

острый лимфобластный лейкоз.

55. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

56. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

57. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому.

58. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

59. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

60. Способ по п. 47, отличающийся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз.

61. Способ по п. 47, отличающийся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

62. Способ лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемой соли, и терапевтически эффективного количества одного или более терапевтических средств.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2.

64. Способ по п. 62, отличающийся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK.

65. Способ по любому из пп. 62-64, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, амилоидоза легкой цепи и злокачественной лимфомы.

67. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой

лейкоз.

68. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз.

69. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что лейкоз представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

70. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

71. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

72. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому.

73. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

74. Способ по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

75. Способ по п. 62, отличающийся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз.

76. Способ по п. 62, отличающийся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

77. Способ по любому из пп. 62-76, отличающийся тем, что одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из IMiD-средства, ингибитора протеасом, стероида, средства на основе антитела к CD38, средства на основе антитела к CD20, ингибитора Vcl-2, ингибитора PI3K, биспецифического антитела, аналога нуклеозида, ингибитора ВТК, средства, алкилирующего ДНК, ингибитора EZH2, антрацилина, ингибитора топоизомеразы, платины, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора HDAC, ингибитора ядерного экспорта, средства, оказывающего воздействие на микротрубочки, L-аспарагиназы, пегилированной аспарагиназы, ингибитора PERK, ингибитора mTOR, иммуномодулирующего средства, ингибитора пути MAPK, ингибитора MEK, ингибитора ERK и ингибитора Ras.

78. Способ по любому из пп. 62-76, отличающийся тем, что одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из L-аспарагиназы, пэгаспаргазы, каласпаргазы пэгол-mnk1, бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, талидомида, помалидомида, леналидомида, дексаметазона, преднизона, даратумумаба, даратумумаба/гиалуронидазы, исатуксимаба, ритуксимаба, обинутумаба, венетоклакса, идегалисиба, копанлисиба, дувелисиба, умбралисиба, гемцитабина, цитарабина, ибрутиниба, акалбрутиниба, занубрутиниба, бендамустина, циклофосфамида, таземестата, доксорубицина, даунорубицина, этопозида, оксалоплатина, карбоплатина, цисплатина, бозутиниба, дазатиниба, иматиниба, нилотиниба, понатиниба, панобиноста, селинекса, винкристина, JZP-458, эриаспазы, PF745 (JZP-341), аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi* (крисантаспазы), аспарагиназы *Escherichia coli* (коласпазы), средства на

основе антитела к PD1, средства на основе антитела к PDL1 и средства на основе антитела к CTLA4.

79. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения заболевания, обусловленного нарушением регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков, у пациента, нуждающегося в этом.

80. Применение по п. 79, отличающееся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой, выбранной из группы, состоящей из киназы PERK и киназы GCN2.

81. Применение по п. 79 или п. 80, отличающееся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой GCN2.

82. Применение по п. 79 или п. 80, отличающееся тем, что нарушение регуляции интегрированной реакции на стресс и/или реакции несвернутых белков обусловлено киназой PERK.

83. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом.

84. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для активации киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом.

85. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для модулирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

86. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для активации киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

87. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для ингибирования киназы GCN2 и ингибирования киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

88. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для модулирования активности киназы GCN2 у пациента, нуждающегося в этом.

89. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для ингибирования активности киназы PERK у пациента, нуждающегося в этом.

90. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения рака у пациента, нуждающегося в этом.

91. Применение по п. 89, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей

из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы.

92. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой лейкоз.

93. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

94. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

95. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

96. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

97. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой лимфому.

98. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

99. Применение по п. 89 или п. 90, отличающееся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

100. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения амилоидоза у пациента, нуждающегося в этом.

101. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения амилоидоза легкой цепи у пациента, нуждающегося в этом.

102. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания, ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом.

103. Применение по п. 101, отличающееся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2.

104. Применение по п. 101, отличающееся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK.

105. Применение по любому из пп. 101-103, отличающееся тем, что заболевание представляет собой рак.

106. Применение по п. 104, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоza, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы.

107. Применение по п. 103 или п. 104, отличающееся тем, что рак представляет собой лейкоз.

108. Применение по п. 103 или п. 104, отличающееся тем, что рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

109. Применение по п. 103 или п. 104, отличающееся тем, что рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

110. Применение по п. 103 или п. 104, отличающееся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

111. Способ по п. 103 или п. 104, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

112. Способ по п. 103 или п. 104, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому.

113. Способ по п. 103 или п. 104, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

114. Способ по п. 103 или п. 104, отличающийся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

115. Применение по п. 101, отличающееся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз.

116. Применение по п. 101, отличающееся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

117. Соединение по любому из пп. 1-22, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения заболевания, выбранного из заболевания, ассоциированного с GCN2, и заболевания,

ассоциированного с PERK, у пациента, нуждающегося в этом.

118. Применение по п. 116, отличающееся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с GCN2.

119. Применение по п. 116, отличающееся тем, что заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с PERK.

120. Применение по любому из пп. 116-118, отличающееся тем, что заболевание представляет собой рак.

121. Применение по п. 119, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из колоректального рака, рака легкого, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака глотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкой кишки, рака молочной железы, рака яичников, опухоли яичка, рака предстательной железы, рака печени, рака щитовидной железы, рака почки, рака матки, хориокарциномы матки, опухоли головного мозга, ретинобластомы, рака кожи, меланомы, саркомы, фибросаркомы, злокачественной опухоли кости, рака мочевого пузыря, гемобластоза, лейкоза, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, эритролейкоза, гистиоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема и злокачественной лимфомы.

122. Применение по п. 119 или п. 120, отличающееся тем, что рак представляет собой лейкоз.

123. Применение по п. 119 или п. 120, отличающееся тем, что лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз.

124. Применение по п. 119 или п. 120, отличающееся тем, что лейкоз представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

125. Применение по п. 119 или п. 120, отличающееся тем, что рак представляет собой фибросаркому.

126. Способ по п. 119 или п. 120, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

127. Способ по п. 119 или п. 120, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому.

128. Способ по п. 119 или п. 120, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

129. Способ по п. 119 или п. 120, отличающийся тем, что рак представляет собой Т-клеточную лимфому.

130. Применение по п. 116, отличающееся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз.

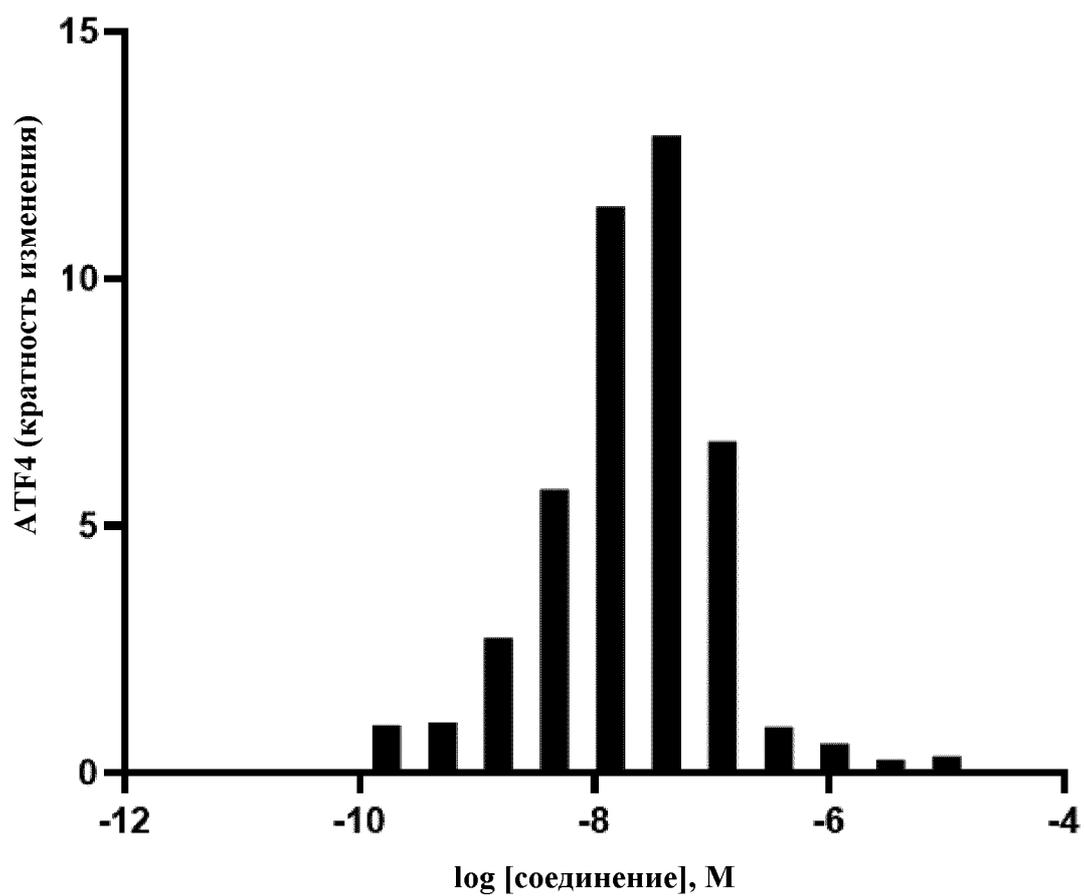
131. Способ по п. 116, отличающийся тем, что заболевание представляет собой амилоидоз легкой цепи.

132. Применение по любому из пп. 116-130, отличающееся тем, что одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из IMiD-средства, ингибитора протеасом, стероида, средства на основе антитела к CD38, средства на основе антитела к CD20, ингибитора Vcl-2, ингибитора PI3K, биспецифического антитела, аналога нуклеозида, ингибитора ВТК, средства, алкилирующего ДНК, ингибитора EZH2, антрациклина, ингибитора топоизомеразы, платины, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора HDAC, ингибитора ядерного экспорта, средства, оказывающего воздействие на микротрубочки, L-аспарагиназы, пегилированной аспарагиназы, ингибитора PERK, ингибитора mTOR, иммуномодулирующего средства, ингибитора пути MAPK, ингибитора MEK, ингибитора ERK и ингибитора Ras.

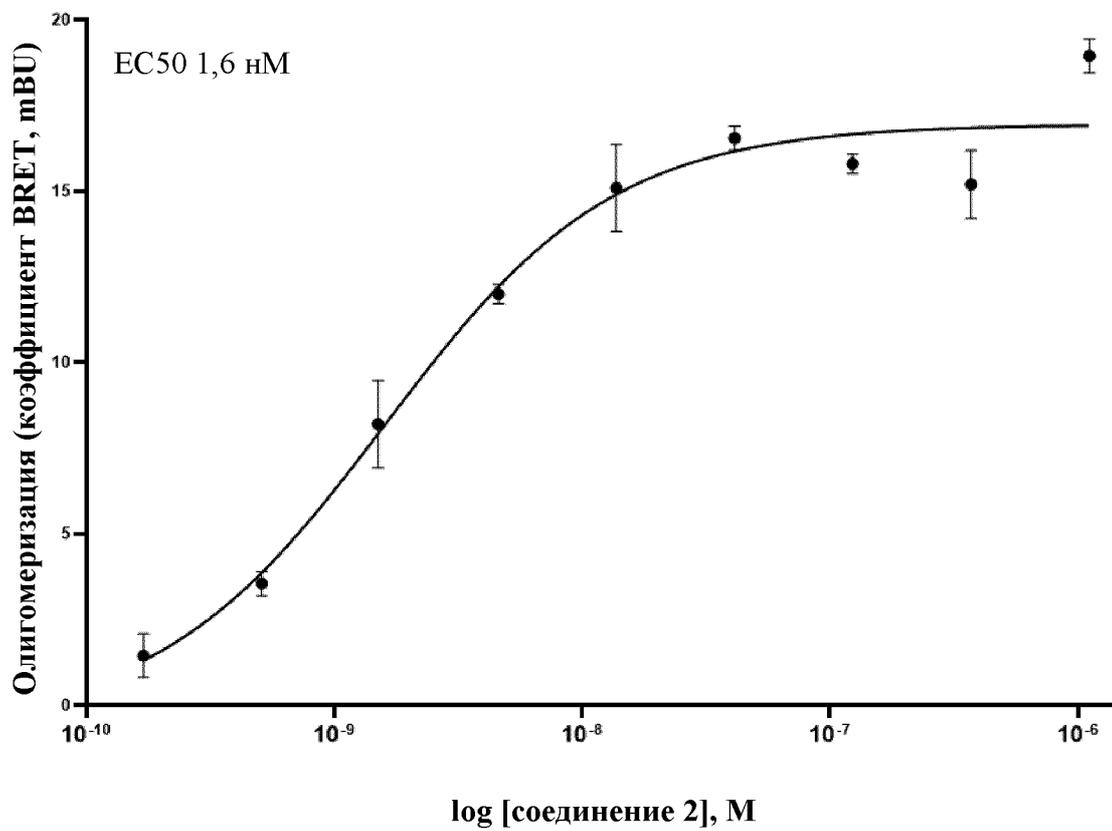
133. Применение по любому из пп. 116-130, отличающееся тем, что одно или более терапевтических средств выбраны из группы, состоящей из L-аспарагиназы, пэгаспаргазы, каласпаргазы пэгол-mnk1, бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, талидомида, помалидомида, леналидомида, дексаметазона, преднизона, даратумумаба, даратумумаба/гиалуронидазы, исатуксимаба, ритуксимаба, обинутузумаба, венетоклакса, идегалисиба, копанлисиба, дувелисиба, умбралисиба, гемцитабина, цитарабина, ибрутиниба, акалабрутиниба, занубрутиниба, бендамустина, циклофосфида, таземетостата, доксорубицина, даунорубицина, этопозида, оксалоплатина, карбоплатина, цисплатина, бозутиниба, дзатиниба, иматиниба, нилотиниба, понатиниба, панобиностата, селинекса, винкристина, JZP-458, эриаспазы, PF745 (JZP-341), аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi* (крисантаспазы), аспарагиназы *Escherichia coli* (коласпазы), средства на основе антитела к PD1, средства на основе антитела к PDL1 и средства на основе антитела к CTLA4.

По доверенности

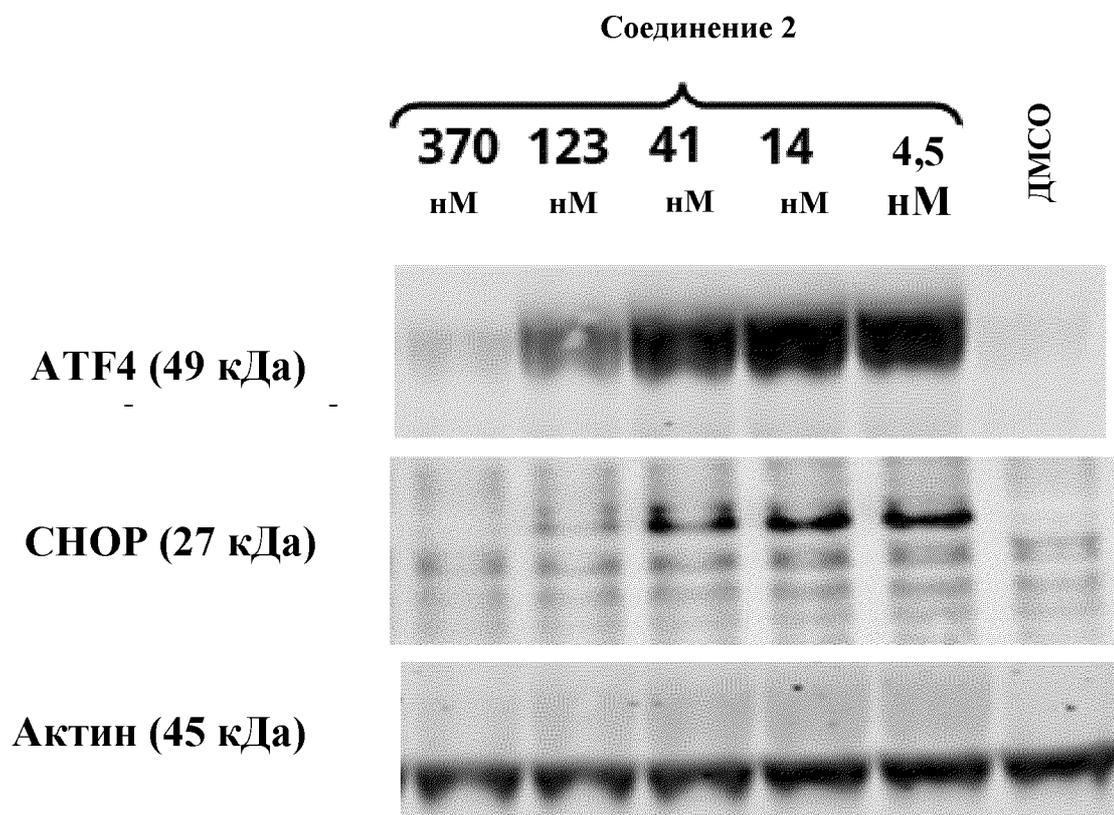
## Изменение уровней ATF



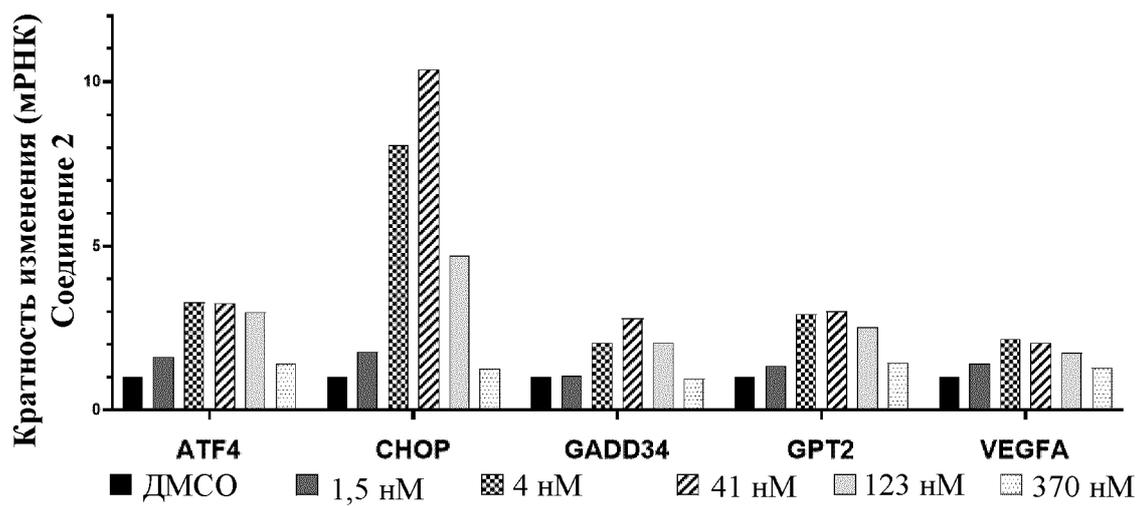
Фиг. 1



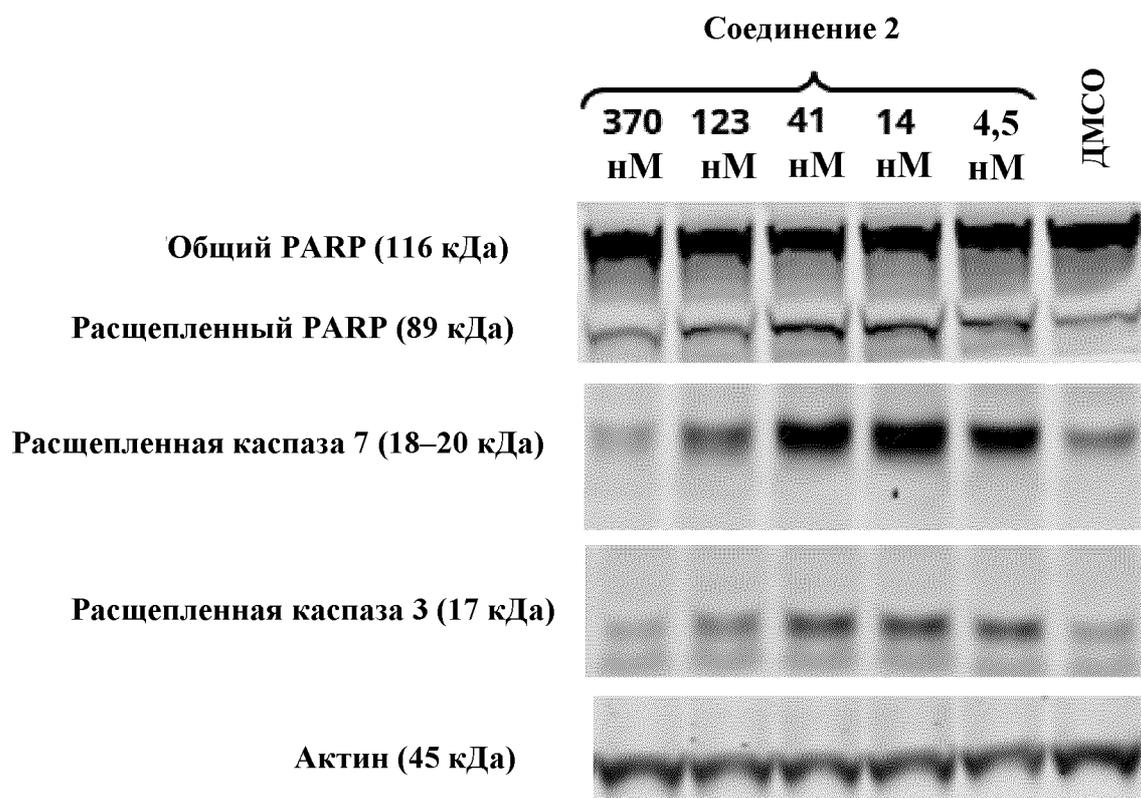
Фиг. 2



Фиг. 3

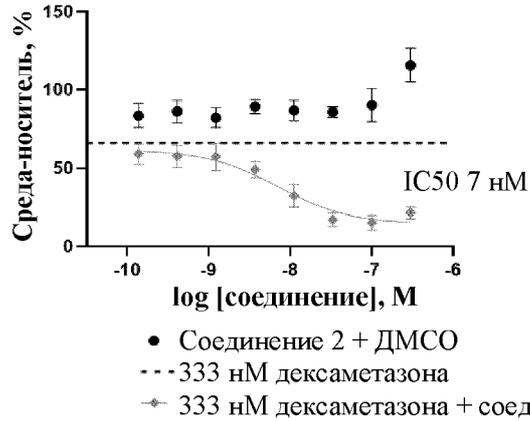


Фиг. 4

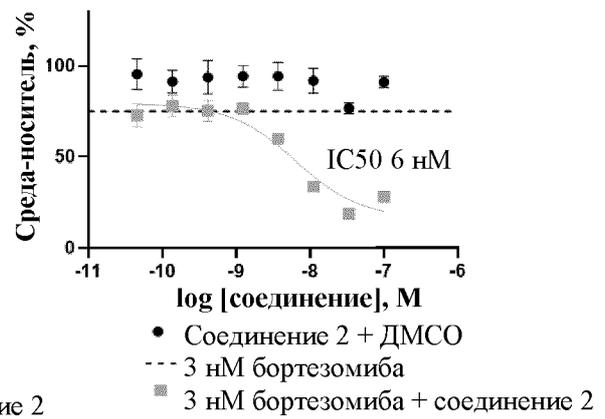


Фиг. 5

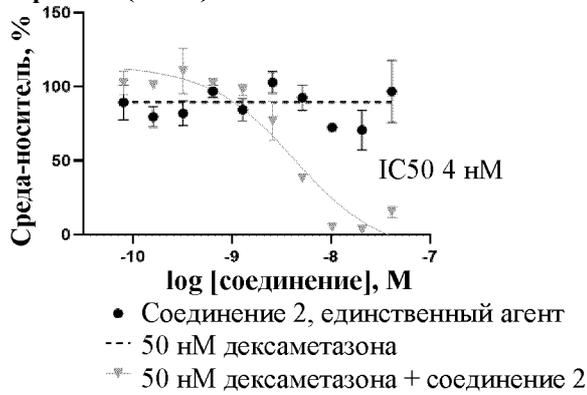
Фиг. 6А  
Пролiferация клеток при множественной миеломе (RPMI8226)



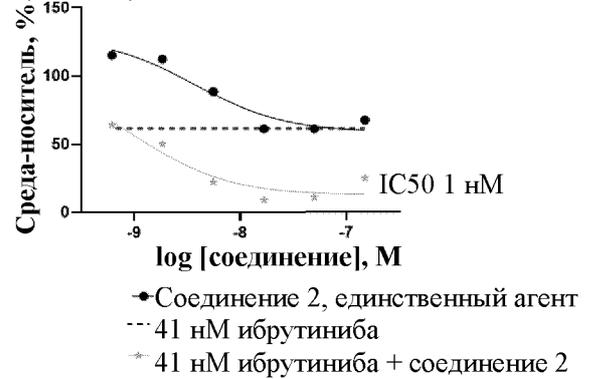
Фиг. 6В  
Пролiferация клеток при множественной миеломе (H929)



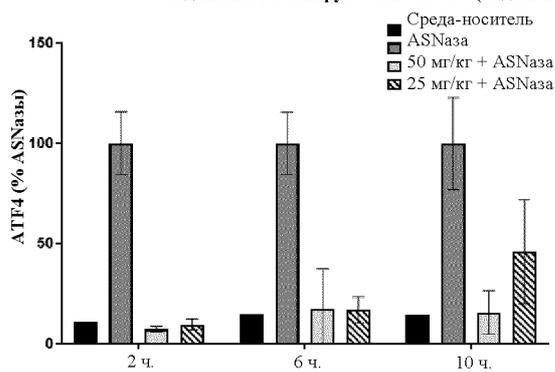
Фиг. 6С  
Пролiferация клеток при лимфоме Беркитта (GA10)



Фиг. 6D  
Пролiferация клеток при фолликулярной лимфоме (DoHH-2)



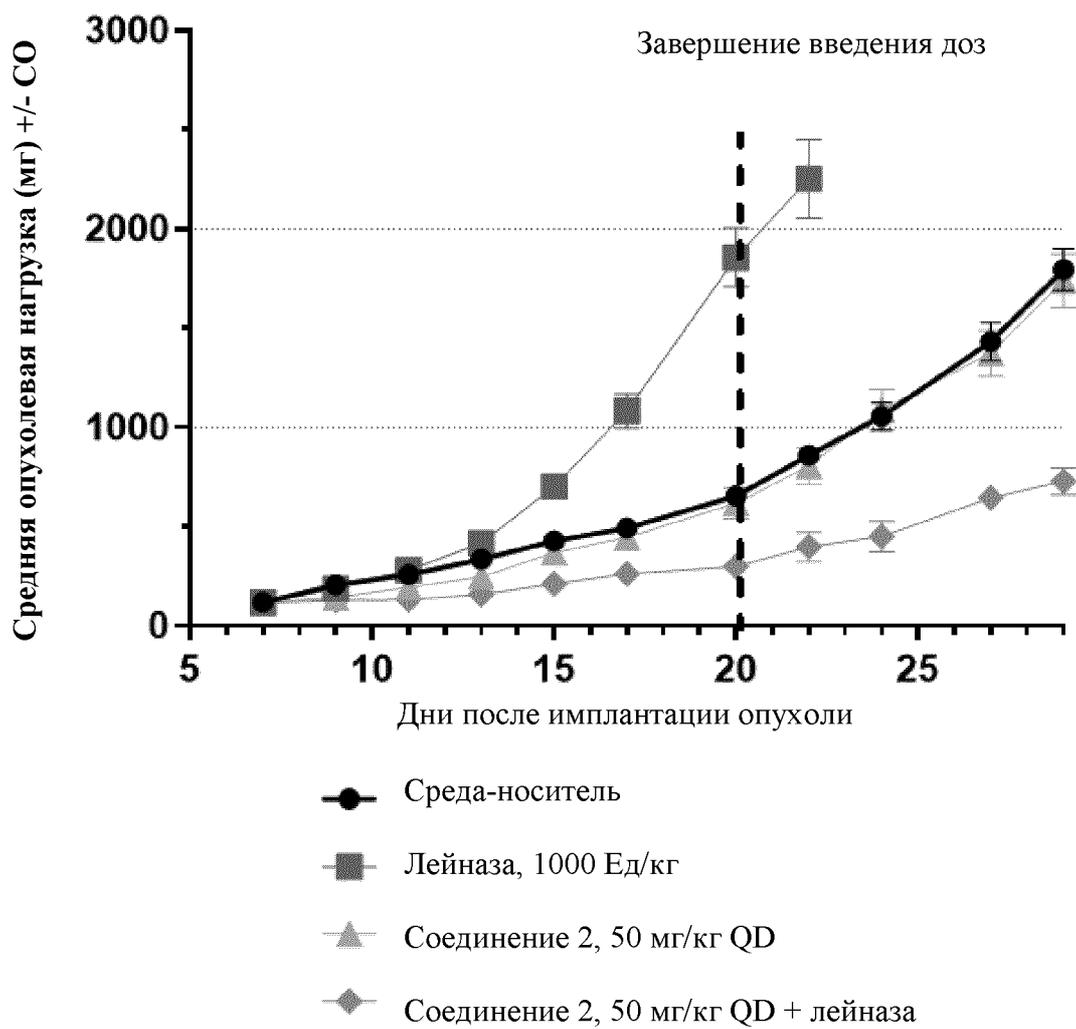
Фиг. 7А

Соединение 2 блокирует ATF4 *in vivo* (модель РК/PD)

Фиг. 7В

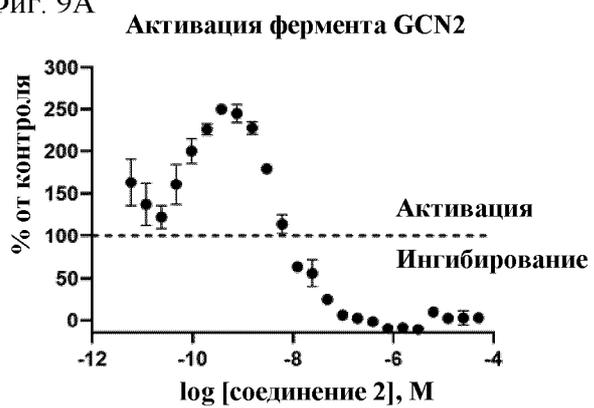
Доза (мг/кг)	Момент времени (ч.)	Уровни лекарственного средства в плазме крови (нг/мл)	Подавление ATF4, %
50	2	32603	88
50	6	28141	91
50	10	27880	87
25	2	11443	79
25	6	24759	93
25	10	2210	57

## Рост опухоли MV-4-11

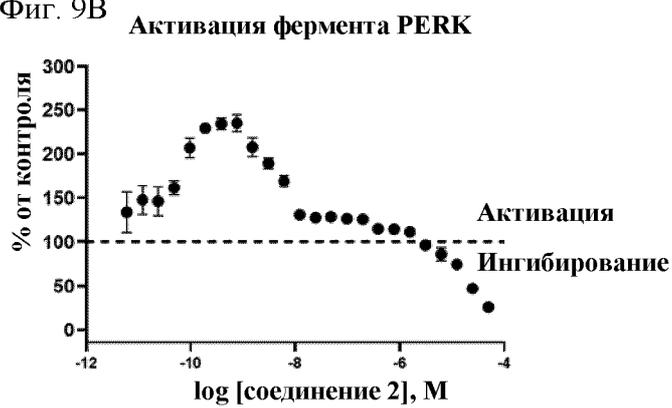


Фиг. 8

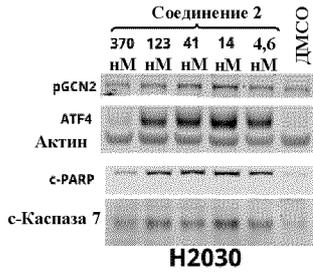
Фиг. 9А



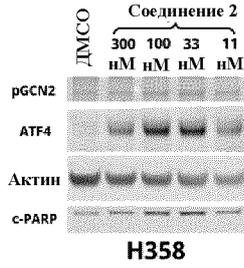
Фиг. 9В



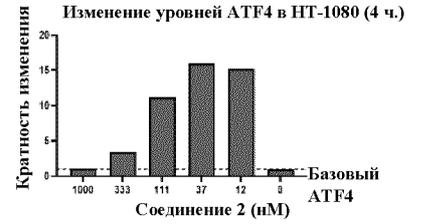
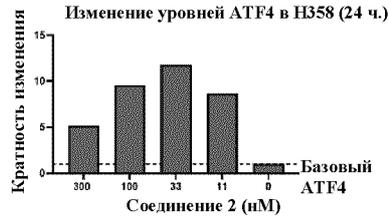
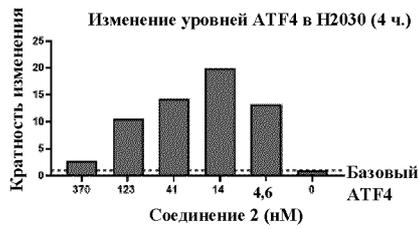
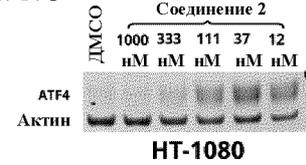
Фиг. 10А



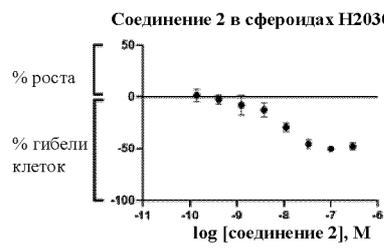
Фиг. 10В



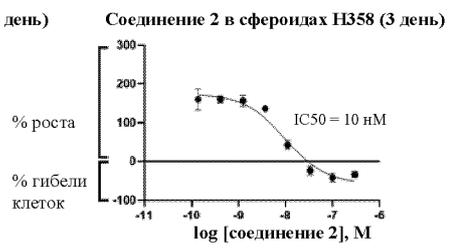
Фиг. 10С



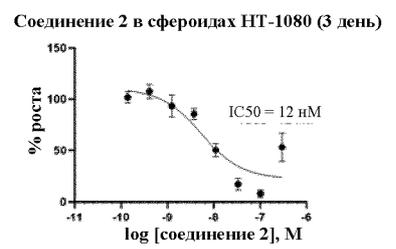
Фиг. 11А



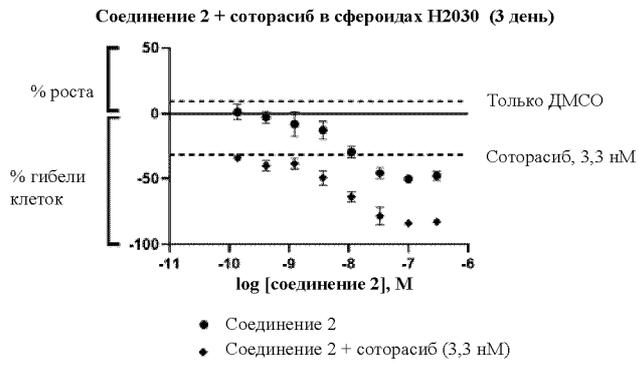
Фиг. 11В



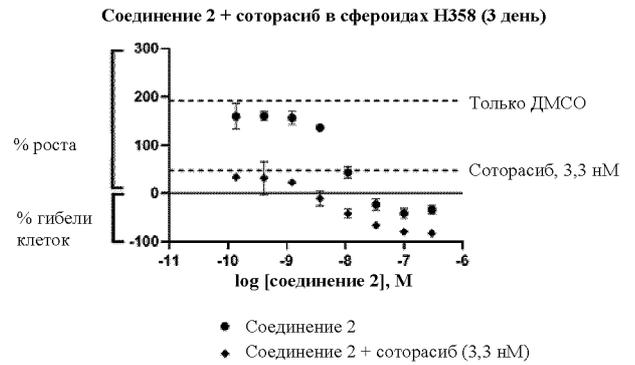
Фиг. 11С



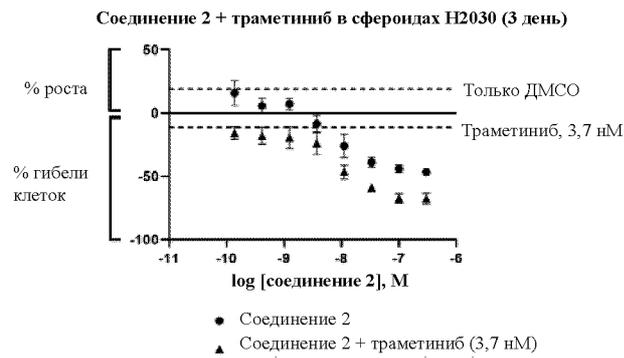
Фиг. 12А



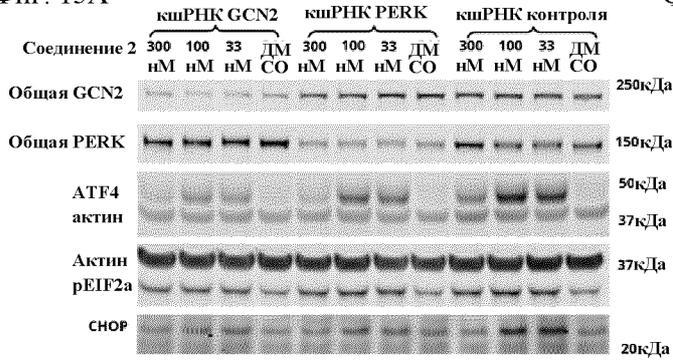
Фиг. 12В



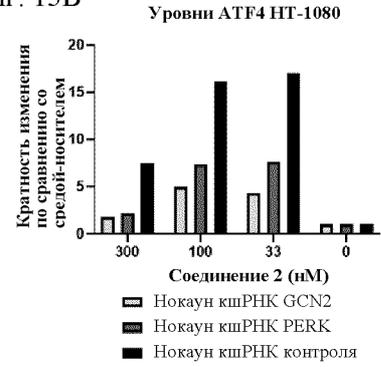
Фиг. 12С



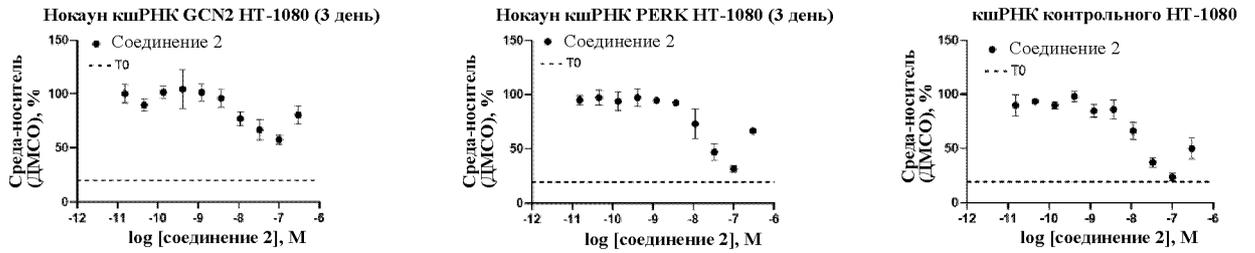
Фиг. 13А

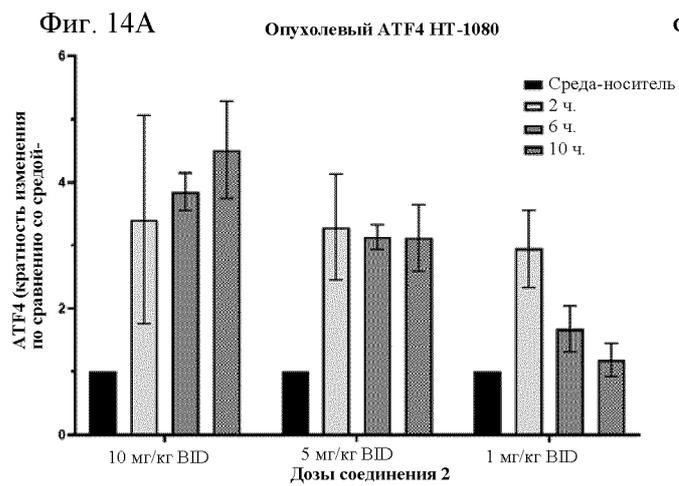


Фиг. 13В



Фиг. 13С

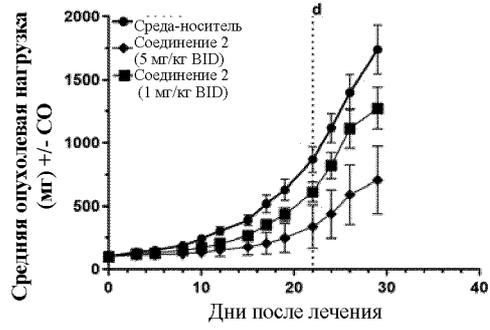




Фиг. 14В

Доза (мг/кг)	Момент времени (ч.)	Уровень соединения 2 в плазме (нг/мл)
10	2	12041
10	6	4797
10	10	2759
5	2	9497
5	6	842
5	10	470
1	2	812
1	6	362
1	10	199

Фиг. 15А Средняя опухолевая нагрузка LoVo (мг)  
Конец введения доз



Фиг. 15В Средняя опухолевая нагрузка HT-1080 (мг)  
Конец введения доз

