



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104603** (13) **C2**  
(51) МПК (2014.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

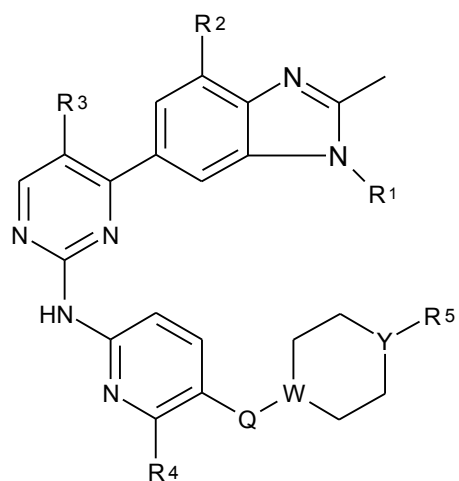
|   |  |
|---|--|
| <p>(21) Номер заявки: <b>а 2011 07836</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>15.12.2009</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.02.2014</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>08380343.7, 61/154,954</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>22.12.2008, 24.02.2009</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.08.2011, Бюл.№ 16</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2014, Бюл.№ 4</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2009/068030, 15.12.2009</b></p> | <p>(72) Винахідник(и):<br/><b>Коутс Дейвід Ендрю (US),<br/>де Діос Магана Альфонсо (US),<br/>де Прадо Гонсалес Ана (ES),<br/>Дель Прадо Каталіна Міріам Філадельфа (ES),<br/>Гарсія Паредес Марія Крістіна (ES),<br/>Гелберт Лоренс Марк (US),<br/>Нобелок Джон Монте (US),<br/>Мартін де ла Нава Ева Марія (ES),<br/>Мартін Ортега Фінгер Марія Долорес (ES),<br/>Мартінес Перес Хосе Антоніо (ES),<br/>Матео Герранс Ана Ізабел (ES),<br/>Перес Мартінес Карлос (ES),<br/>Санчес Мартінес Консепсьон (ES)</b></p> <p>(73) Власник(и):<br/><b>ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,<br/>Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285,<br/>United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник:<br/><b>Шляховецький Олександр Михайлович,<br/>реєстр. №21</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:<br/><b>WO 2005005426 (A1), 20.01.2005<br/>WO 03062236 (A1), 31.07.2003</b></p> |
|---|--|

**(54) ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНКИНАЗ**

**(57) Реферат:**

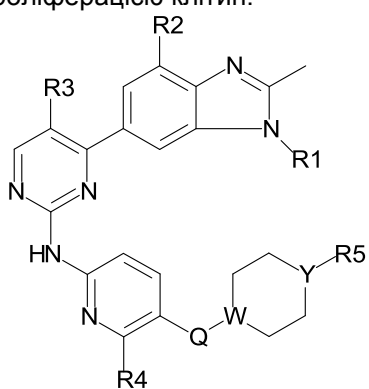
Цей винахід пропонує сполуку Формули (I):

UA 104603 C2



(I)

або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки, яка є корисною при лікуванні захворювань, що характеризуються аномальною проліферацією клітин.



Високогомологічні циклін-залежні кінази (Cdks) CDK4 та CDK6 у комбінації з цикліном D є ключовими регуляторами переходу через точку рестрикції R між G<sub>1</sub>- (ріст) та S- (реплікація ДНК) фазами клітинного циклу. CDK4/6 справляють свій вплив через фосфорилювання ретинобластомного білка (pRb). Після завершення фосфорилювання, pRb втрачає свій

пригнічувальний вплив на транскрипцію генів, що стимулюють входження до S-фази. У протилежність до цього, наслідком специфічного пригнічення активності кіназ CDK4/6 ендогенним білковим модулятором p16<sup>INK4</sup> або дрібномолекулярними інгібіторами є одержання гіпофосфорилюваного pRb та затримка клітин у точці рестрикції G<sub>1</sub>. Як основний механізм регуляції точки рестрикції G<sub>1</sub>, шлях, регульований цими кіназами, змінюється у широкому спектрі людських пухлин і, таким чином, пригнічення CDK4/CDK6 у цих пухлинах чинить терапевтично сприятливу дію, запобігаючи поділу клітин.

Pim-1 являє собою серин/треонін-кіназу, яка регулює різноманітні біологічні функції, у тому числі розвиток клітинного циклу, шляхи транскрипції/трансдукції сигналів та апоптоз, експресія якої пов'язується з раками декількох типів, у тому числі, раком крові, раком передміхурової залози та раком ротової порожнини (M. Bachmann, and T. Moroy, Int. J. Biochem. Cell Biol., 2005. 37(4): p. 726-30).

Інгібітори кіназ є відомими у цій галузі. У WO 98/11095 описаний ряд заміщених 2-піримідинамінів, охарактеризованих як інгібітори кіназ, зокрема, кіназ p56<sup>lck</sup>, ZAP-70 та протеїнкінази C. У WO 98/11095 не описано пригнічення Cdks.

Ряд 2-(піридин-2-іламіно)-піридо-[2,3-d]-піримідин-7-онів, охарактеризованих як такі, що мають активність з пригнічення CDK4/6, описані в WO 03/062236. Ці сполуки охарактеризовані як такі, що є придатними для лікування клітинно-проліферативних розладів, наприклад, раку та рестенозу. Однак, згадані сполуки є недостатньо розчинні у водному розчині і не демонструють значної активності пригнічення інших (не-Cdk) кіназ-мішеней.

Залишається потреба у інгібіторах CDK4/6, які можуть застосовуватись для лікування клітинно-проліферативних розладів, таких як рак. Цей винахід пропонує інгібітори CDK4/6. Деякі сполуки за цим винаходом є більш активними інгібіторами CDK4/6, ніж деякі сполуки, відомі у цій галузі.

Крім того, існує потреба у інгібіторах CDK4/6, які є селективними відносно CDK4/6, порівняно з іншими Cdks, і, завдяки цьому, здатними до спричинення специфічної затримки G<sub>1</sub> у разі присутності у фармакологічно відповідних концентраціях. Цей винахід пропонує інгібітори CDK4/6, що є здатними до спричинення специфічної затримки G<sub>1</sub> у разі присутності у фармакологічно прийнятних концентраціях.

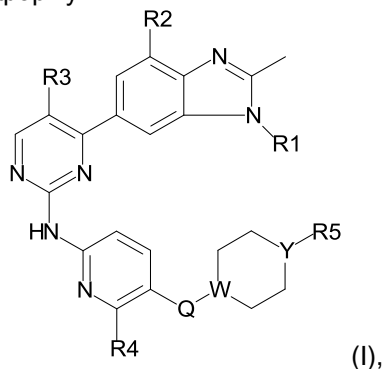
Залишається також потреба у інгібіторах CDK4/6 з поліпшеною розчинністю у водному розчині. Деякі сполуки за цим винаходом мають поліпшену розчинність у водному розчині, порівняно з певними сполуками, відомими у цій галузі.

Крім того, залишається потреба у інгібіторах CDK4/6, які мають поліпшений розподіл у тканині головного мозку і можуть, завдяки цьому, застосовуватись для лікування розладів, які проявляються в головному мозку, наприклад, первинних та метастатичних пухлин головного мозку. Деякі сполуки за цим винаходом мають поліпшений розподіл у тканині головного мозку.

Існує також потреба у інгібіторах CDK4/6 з добрими фармакокінетичними властивостями, такими як придатність для перорального введення. Деякі сполуки за цим винаходом мають поліпшену придатність для перорального введення, у порівнянні з певними сполуками, відомими у цій галузі.

Також, існує потреба у інгібіторах кіназ, які мають вторинну пригнічувальну активність по відношенню до інших не-Cdk кіназ, наприклад, Pim-1-кінази. Певні сполуки за цим винаходом мають подвійну пригнічувальну активність як по відношенню до CDK4/6, так і по відношенню до Pim-1-кінази.

Цей винахід пропонує сполуки формули I:



де

R1 – C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-алкіл, C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-циклоалкіл або циклопропілметил;

R2 та R3 – H або фтор, де щонайменше один із R2 або R3 – фтор;

R4 – H або CH<sub>3</sub>;

5 R5 – C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкіл або -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, де R6 та R7 – C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл;

Q – CH<sub>2</sub>, O, S або безпосередній зв'язок;

та

W та Y – C або N, де щонайменше один із W або Y – N, та де якщо Q – O або S, то W – C;

або фармацевтично прийнятні солі цих сполук.

10 Цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та фармацевтично прийнятні носій, розріджувач або допоміжну речовину.

Цей винахід пропонує сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки для застосування у терапії.

15 Цей винахід пропонує сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки для застосування при лікуванні раку. Зокрема, цей рак вибраний з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, рак молочної залози, рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), рак простати, гліобластома, лімфома клітин кори головного мозку (MCL), хронічний мієлоїдний лейкоз (CML) та гострий мієлоїдний лейкоз (AML).

20 Цей винахід також пропонує спосіб лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, рак молочної залози, рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), рак простати, гліобластома, лімфома клітин кори головного мозку, хронічний мієлоїдний лейкоз та гострий мієлоїдний лейкоз у ссавця, який включає введення в організм ссавця, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки за цим винаходом або фармацевтично прийнятної солі цієї сполуки.

25 Крім того, цей винахід пропонує застосування сполуки за цим винаходом або фармацевтично прийнятної солі цієї сполуки для виготовлення лікарського засобу для лікування раку. Зокрема, цей рак вибраний з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, рак молочної залози, рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), рак простати, гліобластома, лімфома клітин кори головного мозку, хронічний мієлоїдний лейкоз та гострий мієлоїдний лейкоз.

30 Крім того, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію для застосування у терапії, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та фармацевтично прийнятні носій, розріджувач або допоміжну речовину. Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію для лікування раку ободової та прямої кишки, раку молочної залози, раку легенів, особливо недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), раку простати, гліобластоми, лімфоми клітин кори головного мозку, хронічного мієлоїдного лейкозу та гострого мієлоїдного лейкозу, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та фармацевтично прийнятні носій, розріджувач або допоміжну речовину.

40 Загальні хімічні терміни, вжиті вище у формулах, мають свої звичайні значення. Наприклад, термін "C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-алкіл" означає нерозгалужений або розгалужений, одновалентний, насичений аліфатичний ланцюг з трьох-п'яти атомів вуглецю та охоплює, проте без обмеження, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил та трет-бутил.

45 Термін "C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-циклоалкіл" означає насичену вуглецеву циклічну систему, яка містить три-п'ять атомів вуглецю.

Фахівцю має бути зрозуміло, що більшість або всі сполуки за цим винаходом здатні утворювати солі. Сполуки за цим винаходом є амінами, та відповідно реагують з будь-якою з численних неорганічних та органічних кислот з утворенням фармацевтично прийнятних солей з кислотами. Такі фармацевтично прийнятні солі з кислотами та загальна методологія їх одержання є добре відомими в галузі. Дивись, наприклад, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); L.D. Bighley, S.M. Berge, D.C. Monkhouse, у "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, стор. 453-499; S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977. Серед солей перевага віддається гідрохлоридам та мезилатам. Солями, яким віддається особлива перевага, є мезилати.

60 За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де R1 – ізопропіл, циклопропіл, циклопентил або циклопропілметил. За варіантом, якому віддається більша перевага, R1 – ізопропіл.

За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де R2 – фтор, та R3 – водень. За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де R2 – водень, та R3 – фтор. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, кожен з R2 та R3 є фтором.

5 За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де R4 – водень. Альтернативно R4 за варіантом, якому віддається перевага, – метил. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, R4 – водень.

За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де R5 – C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл або -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, де R6 та R7 – C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл. За варіантом, якому віддається більша перевага, R6 та R7 – етил. За варіантом, якому віддається більша перевага, R5 – C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, R5 – етил.

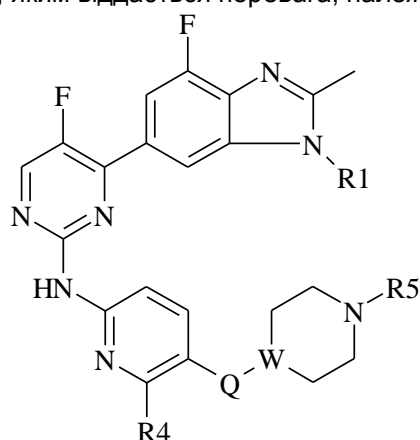
За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де Q – CH<sub>2</sub> або безпосередній зв'язок. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, Q – CH<sub>2</sub>.

За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де Y – N.

15 За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де W – N.

За варіантом, якому віддається перевага, цей винахід охоплює сполуки Формули I, де обидва з W та Y – N.

До сполук за цим винаходом, яким віддається перевага, належать сполуки формули:



20 Формула II

де:

R1 – ізопропіл, циклопропіл, циклопентил або циклопропілметил;

R4 – H або CH<sub>3</sub>;

R5 – C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл;

25 Q – CH<sub>2</sub>, O або безпосередній зв'язок;

та

W – C або N, де якщо Q – O, то W – C;

або фармацевтично прийнятні солі цих сполук.

30 Особлива перевага віддається сполукам, приклади яких наведені у цьому описі, або фармацевтично прийнятним солям цих сполук. Сполукою, якій віддається більш особлива перевага, є [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки. [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін може мати альтернативну назву 2-піримідинамін-N-[5-[(4-етил-1-піперазиніл)метил]-2-піридиніл]-5-фтор-4-[4-фтор-2-метил-1-(1-метилетил)-1Н-бензimidазол-6-іл].

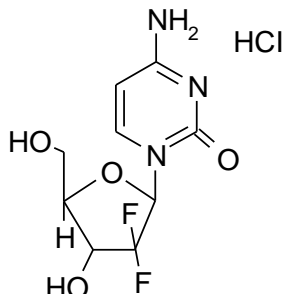
35 Особлива перевага віддається кристалічній формі III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну, яка характеризується порошковою рентгенодифрактограмою (джерело випромінювання CuKα, (λ=1,54056 Å), яка містить пік при 21,29 (±0,1° 2θ), та факультативно одним або декількома піками, вибраними з групи, яка включає в себе 11,54, 10,91, та 12,13 (2θ±0,1°). Кристалічна форма III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну може також характеризуватися спектром <sup>13</sup>C ЯМР, який містить піки хімічних зсувів ν(F1) [млн<sup>-1</sup>] при 112,7, 127,3 та 129,4.

45 Сполуки за цим винаходом є специфічними інгібіторами CDK4 та CDK6, і тому є корисними при лікуванні захворювань або розладів, які характеризуються аномальною проліферацією клітин. Зокрема, сполуки за цим винаходом є корисними при лікуванні раку.

CDK4 та CDK6 модулюють свій вплив на клітинний цикл через фосфорилювання pRb. Сполуки за цим винаходом, що є активними інгібіторами активності CDK4/6 і, отже, фосфорилювання pRb, будуть пригнічувати проліферацію клітин (і, отже, ріст пухлин) у разі раку будь-якого типу, де клітини проліферують і містять функціональний, інтактний ген Rb1 (який кодує pRb). Таким чином, сполуки за цим винаходом є корисними при лікуванні pRb<sup>+</sup> раків, таких як рак ободової та прямої кишки, рак молочної залози, рак легенів, рак простати, хронічний мієлоїдний лейкоз, гострий мієлоїдний лейкоз (Fry D.W. et al. *Mol. Cancer Ther.* (2004), 3(11), 1427), лімфома клітин кори головного мозку (Marzec M. et al., *Blood* (2006), 108(5), 1744) рак яєчників (Kim T.M. et al., *Cancer Research* (1994), 54, 605), рак підшлункової залози (Schutte M. et al., *Cancer Research* (1997), 57, 3126) злоякісна меланома та метастатична злоякісна меланома (Maeldandsmo G.M. et al., *British Journal of Cancer* (1996), 73, 909), у ссавців. Сполуки за цим винаходом також ймовірно є корисними при лікуванні рабдомиосаркоми (Saab R. et al., *Mol. Cancer Ther.* (2006), 5(5), 1299) та множинної мієломи (Baughn L.B. et al., *Cancer Res.* (2006), 66(15), 7661) у ссавців. Серед ссавців перевага при лікуванні віддається людині.

Також сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, демонструють корисну властивість, яка полягає у тому, що вони мають поліпшений розподіл у тканині головного мозку. Наприклад, у разі застосування на паціючій моделі сполуки за Прикладом 16, коефіцієнт експозиції у головному мозку:плазмі (визначений із застосуванням площі під кривою (AUC) або максимальних концентрацій у плазмі та головному мозку (C<sub>max</sub>), дивись Таблицю 6с) дорівнює приблизно 1, що вказує на те, що сполука за Прикладом 16 добре розподіляється у головному мозку. У протилежність до цього, автори винаходу визначили, що сполука, якій віддається перевага у WO 03/062236 (6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-піперазин-1-іл-піридин-2-іламіно)-8H-піrido[2,3-d]піримідин-7-он), демонструє коефіцієнти розподілу у головному мозку:плазмі 0,17 (AUC) та 0,1 (C<sub>max</sub>), що вказують на те, що згадана сполука на цій моделі у тканині головного мозку розподіляється відносно слабо. Отже, сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, здатні проникати в головний мозок, і тому є корисними при лікуванні первинних та метастатичних пухлин головного мозку, де клітини проліферують та містять функціональний інтактний ген Rb1. До прикладів таких pRb<sup>+</sup> пухлин головного мозку належать гліобластома, а також медулобластома та астроцитома (Lee W.-H. et al., *Science* (1987), 235, 1394). Темозоломід (temozolomide) є цитотоксичним ДНК-алкілувальним агентом, який застосовують для лікування пухлин головного мозку, в тому числі гліобластоми та астроцитоми (Friedman H.S. et al. (2000), *Clin. Cancer Res.* 6(7): 2585-2597), в тому числі метастазів меланоми, раку молочної залози та недрібноклітинного раку легенів (NSCLC) у головний мозок (Siena S. et al. (2009) *Annals of Oncology*, doi:10.1093/annonc/mdp343). Темозоломід взаємодіє з ДНК, спричинюючи хімічне модифікування/пошкодження (Marchesi F., et al. (2007), *Pharmacol. Res.* 56(4): 275-287). Сполуки за цим винаходом можна застосовувати в комбінації з темозоломідом для лікування первинних та метастатичних pRb<sup>+</sup> пухлин головного мозку, таких як гліобластома та астроцитома, наприклад, коли такі метастази походять з меланоми, раку молочної залози або недрібноклітинного раку легенів (NSCLC).

Гідрохлорид гемцитабіну (Gemcitabine), аналог нуклеозиду, який виявляє протипухлинну активність, – моногідрохлорид 2'-дезоксид-2',2'-дифторцитидину (β-ізомер), також відомий як моногідрохлорид 2',2'-дифтор-2'-дезоксидцитидину або як 1-(4-аміно-2-оксо-1H-піримідин-1-іл)-2-дезоксид-2',2'-дифторрибоза. Гідрохлорид гемцитабіну описаний у патенті США № 5,464,826. Структурна формула зображена нижче:



Гідрохлорид гемцитабіну є ефективним при лікуванні недрібноклітинного раку легенів (NSCLC) (Sandler A. та Ettinger D.S., (1999), *The Oncologist*, 4, 241), раку підшлункової залози (Pino S.M. et al., (2004), *Current Gastroenterology Reports*, 6, 119), раку яєчників (Pfisterer J. et al., (2006), *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), 4699) та метастатичного раку молочної залози (Chap S., et al., (2009), *Journal of Clinical Oncology*, 27(11), 1753). Сполуки за цим винаходом можна застосовувати в комбінації з гідрохлоридом гемцитабіну для лікування недрібноклітинного раку

легенів (NSCLC), раку підшлункової залози, раку яєчників та метастатичного раку молочної залози.

Сполуки за цим винаходом можна застосовувати в способі лікування раку, зокрема, ракових захворювань, описаних вище, у ссавця, який включає введення в організм ссавця, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки за цим винаходом. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати в способі лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, лімфома клітин кори головного мозку, рак молочної залози, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC). За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати в способі лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів. За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуку за цим винаходом можна застосовувати в способі лікування гліобластоми або астроцитоми у ссавця, який включає введення в організм ссавця, який потребує такого лікування, терапевтично ефективної комбінації сполуки за цим винаходом та темозоломід. За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуку за цим винаходом можна застосовувати в способі лікування недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), раку підшлункової залози, раку яєчників або метастатичного раку молочної залози у ссавця, який включає введення в організм ссавця, який потребує такого лікування, терапевтично ефективної комбінації сполуки за цим винаходом та гідрохлориду гемцитабіну.

Сполуки за цим винаходом можна застосовувати для лікування ракового захворювання, зокрема, ракових захворювань, описаних вище. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, лімфома клітин кори головного мозку, рак молочної залози, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC). За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує сполуку за цим винаходом для одночасного, окремого або послідовного застосування в комбінації з темозоломідом при лікуванні гліобластоми або астроцитоми. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує сполуку за цим винаходом для одночасного, окремого або послідовного застосування в комбінації з гідрохлоридом гемцитабіну при лікуванні недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), раку підшлункової залози, раку яєчників або метастатичного раку молочної залози.

Крім того, сполуки за цим винаходом можна застосовувати для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, зокрема, ракових захворювань, описаних вище. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, лімфома клітин кори головного мозку, рак молочної залози, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC). За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, сполуки за цим винаходом можна застосовувати для виготовлення лікарського засобу для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування гліобластоми або астроцитоми, причому цей лікарський засіб також містить темозоломід або призначений для одночасного, окремого або послідовного введення з темозоломідом. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), раку підшлункової залози, раку яєчників або метастатичного раку молочної залози, причому цей лікарський засіб також містить гідрохлорид гемцитабіну або призначений для одночасного, окремого або послідовного введення з гідрохлоридом гемцитабіну.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію для лікування раку, зокрема, ракових захворювань, описаних вище, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки разом із фармацевтично прийнятним носієм. За варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки,

лімфома клітин кори головного мозку, рак молочної залози, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів, особливо недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки разом із фармацевтично прийнятним носієм. За варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію для лікування раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, гліобластома, гострий мієлоїдний лейкоз та рак легенів, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки разом із фармацевтично прийнятним носієм. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію для лікування гліобластоми або астроцитом, яка містить сполуку за цим винаходом та темозоломід, разом із фармацевтично прийнятним носієм. За іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію для лікування недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), раку підшлункової залози, раку яєчників або метастатичного раку молочної залози, яка містить сполуку за цим винаходом та гідрохлорид гемцитабіну, разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та темозоломід разом із фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або допоміжною речовиною.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та гідрохлорид гемцитабіну разом із фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або допоміжною речовиною.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку за цим винаходом або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки разом із фармацевтично прийнятним носієм та факультативно іншими терапевтичними інгредієнтами.

Крім того, наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, також є інгібіторами Pim-1. Як вказувалось вище, Pim-1 являє собою серин/треонін-кіназу, яка є залученою до регуляції різноманітних біологічних функцій, у тому числі розвитку клітинного циклу, шляхів транскрипції/трансдукції сигналів та апоптозу, експресія якої пов'язується з раками декількох типів. Зокрема, було показано, що пригнічення Pim-1 дрібномолекулярним інгібітором K00135 порушує виживаність та клоногенний ріст панелі клітин людського гострого лейкозу (Pogacic, V., et al., Cancer Res. (2007). 67(14): p. 6916-24). Окрім того, було показано, що Pim-1 експресується у неоінтимі сонних артерій пацієнтів, пошкоджених балонним катетером, який вводиться до просвіту судин, та у грудних аортах і коронарних артеріях людей з потовщенням інтими. Крім того, специфічне пригнічення функції Pim-1 явно пригнічує як утворення неоінтими після пошкодження балонним катетером, який вводиться до просвіту судин, так і проліферацію культивованих гладеньком'язових клітин судин (VSMCs), що дозволяє припустити, що Pim-1 відіграє критичну роль у проліферації таких клітин. Проліферація VSMCs залучена до патогенезу оклюзивних судинних захворювань, наприклад, атеросклерозу і рестенозу, і тому очікується, що пригнічення Pim-1 буде пригнічувати проліферацію VSMC і, таким чином, буде корисним при лікуванні оклюзивних судинних захворювань (Katakami N., et al., JBC (2004), 279(52), 54742-54749).

Відповідно, сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, або фармацевтично прийнятні солі цих сполук можна застосовувати в способі лікування оклюзивного судинного захворювання, такого як атеросклероз або рестеноз у ссавця, який включає введення в організм ссавця, який потребує такого лікування, ефективною кількістю сполуки за цим винаходом. Сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, або фармацевтично прийнятні солі цих сполук можна застосовувати при лікуванні оклюзивного судинного захворювання, такого як атеросклероз або рестеноз. Крім того, сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, або фармацевтично прийнятні солі цих сполук можна застосовувати для виготовлення лікарського засобу для лікування оклюзивного судинного захворювання, такого як атеросклероз або рестеноз. Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію для лікування оклюзивного судинного захворювання, такого як атеросклероз або рестеноз, яка містить сполуку за цим винаходом, якій віддається перевага, або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки.

При вживанні у цьому описі, "год" означає годину або години, "хв" означає хвилину або хвилини, "Cdk" означає циклінзалежну кіназу, "pRb" означає білок ретинобластоми, "MCL" означає лімфому клітин кори головного мозку, "AML" означає гострий мієлоїдний лейкоз, "CML" означає хронічний мієлоїдний лейкоз, "Boc" означає N-трет-бутоксикарбоніл, "EA" означає етилацетат, "DCM" означає дихлорметан, "DMSO" означає диметилсульфоксид, "DMA" означає диметилацетамід, "THF" означає тетрагідрофуран, "MtBE" означає метил-трет-бутиловий ефір,



"TEA" означає триетиламін, "FBS" означає сироватку плода корови, "PBS" означає забуферений фосфатом фізіологічний розчин, "BSA" означає бичачий сироватковий альбумін, "к.т." означає кімнатну температуру, "мг/кг" означає міліграми на кілограм, "po" означає per os (перорально), "qd" означає однокдобову дозу, "HPLC" означає рідинну хроматографію високого розділення, "q2d" означає одну дозу кожні 2 доби, "q2d×10" означає одну дозу кожні 2 доби 10 разів, "VSMC" означає клітини гладеньких м'язів судин та "XRD" означає рентгенівську дифракцію.

Сполуки Формули I можуть бути одержані фахівцем у галузі із застосуванням загальновідомих обладнання та методик. Більш конкретно, сполуки Формули I можуть бути одержані за описаними нижче схемами, методами та прикладами. Фахівцю в галузі має бути зрозуміло, що для одержання сполуки Формули I окремі стадії в наведених нижче схемах можна змінювати. Реагенти та вихідні матеріали є легкодоступними для фахівця в галузі. Усі замісники, якщо конкретно не зазначено інше, відповідають наведеному вище визначенню.

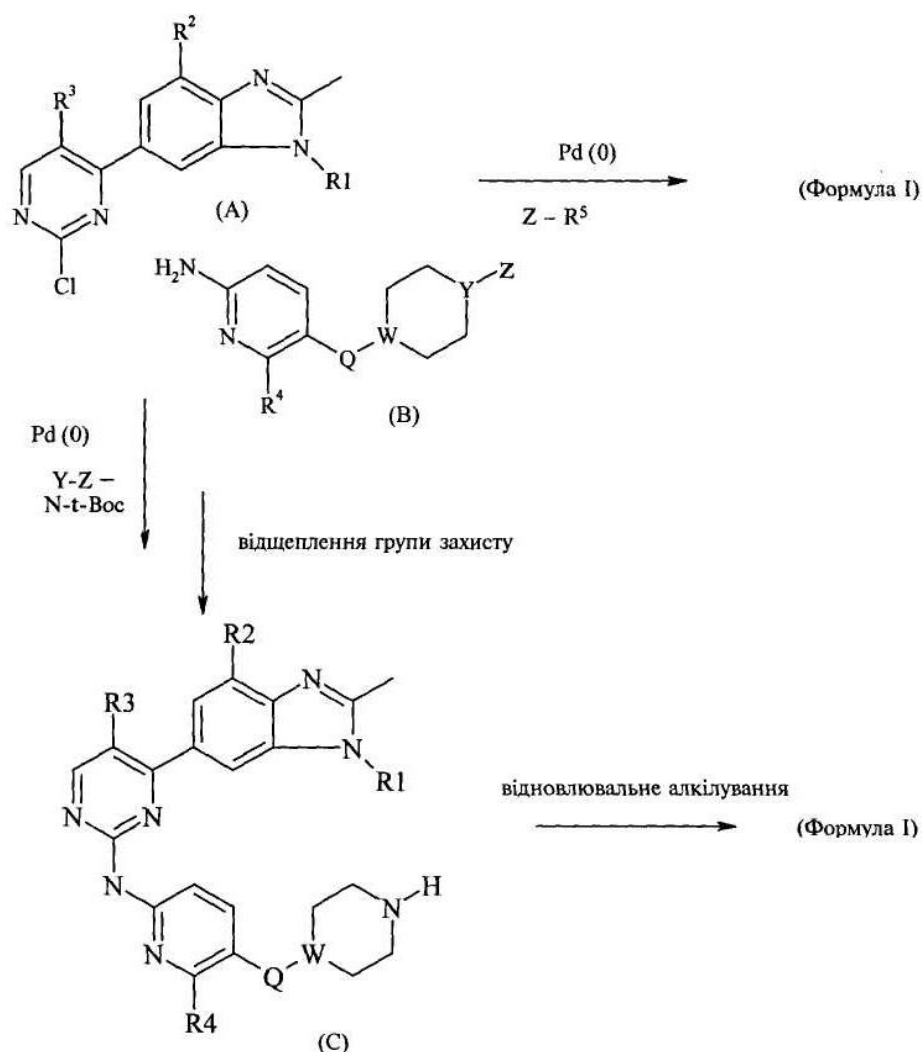
Назви сполук в наведених нижче підготовчих синтезах та прикладах утворені із застосуванням програми ChemDraw® Ultra 5,0.

Схеми

Синтез сполук Формули I ілюстрований підготовчими синтезами, прикладами та схемами, де  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W та Y відповідають наведеним вище визначенням.

Схема 1

Сполуки Формули I одержують із застосуванням каталізованих паладієм (0) реакцій сполучення, як показано на схемі 1:



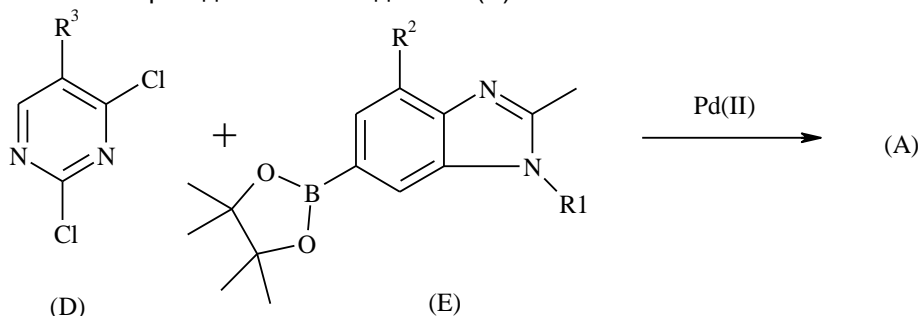
Як показано на верхній реакції схеми 1, якщо Z – R<sup>5</sup>, то піримідиніл-бензімідазолхлорид (A) вводять у взаємодію з піридиніламіном (B) за допомогою каталізованої паладієм реакції сполучення, з утворенням безпосередньо сполуки Формули I.

Як показано на нижній реакції схеми 1, якщо Y-Z – N-трет-бутоксикарбоніл (Boc), то піримідинілгалогенід (A) також сполучають з піридиніламіном (B), а Boc-групу видаляють дією сильної кислоти з одержанням вільного аміну (C). На закінчення, амін (C) алкілюють у

відновлювальних умовах з одержанням сполуки Формули I.

#### Схема 2

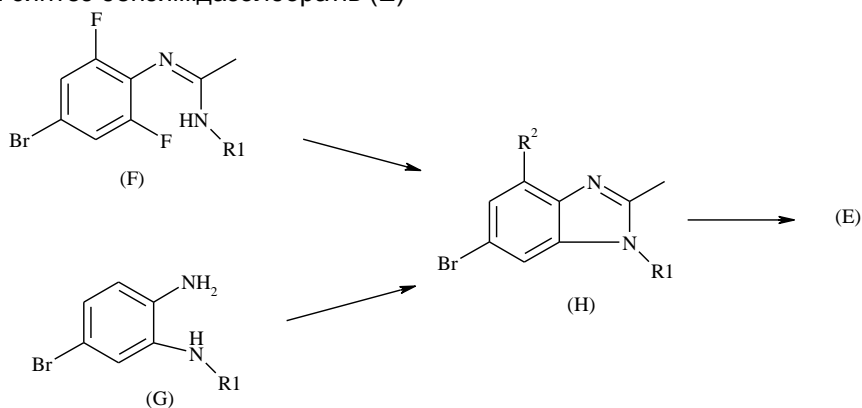
Підготовчий синтез піримідиніл-бензімідазолів (A)



- 5 Піримідиніл-бензімідазоли (A) одержують із застосуванням каталізованих паладієм (II) реакцій сполучення наявних у продажу піримідиніл дихлоридів (D) та бензімідазолборатів (E).

#### Схема 3

Підготовчий синтез бензімідазолборатів (E)

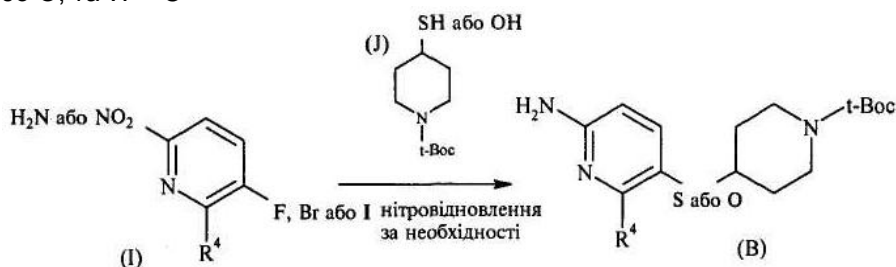


- 10 Бензімідазолборати (E) одержують шляхом каталізованого Pd(II) борилування броміду в бензімідазолах (H) біс(пінаколато)дибором. Бензімідазоли (H) в свою чергу одержують шляхом циклізування амідинів (F) трет-бутилатом калію або конденсування бензолдіамінів (G) з триетилортоацетатом/оцтовою кислотою.

- 15 Амідини (F) одержують як відомо фахівцю у галузі органічного синтезу конденсуванням 4-бром-2,6-дифторфеніламіну з моно-ацетамідним похідним амінів R1-NH<sub>2</sub> у присутності фосфорилхлориду. Бензолдіаміни (G) одержують у дві стадії як відомо фахівцю у галузі органічного синтезу шляхом заміни бром у 2 положенні в 2,4-дибром-нітробензолі амінами R1-NH<sub>2</sub> з подальшим відновленням нітрогрупи до аміногрупи.

#### Схема 4

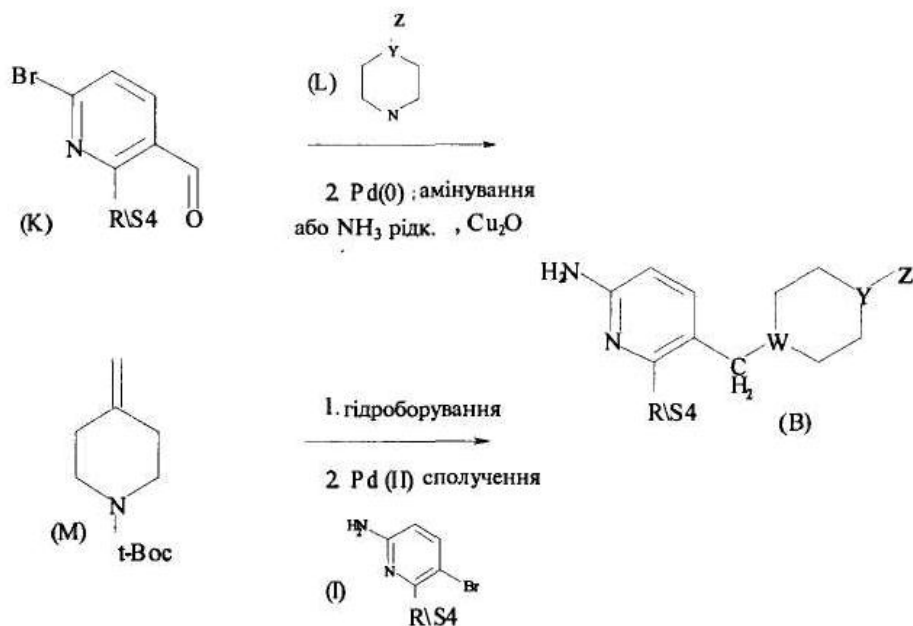
- 20 Підготовчий синтез піридиніламінів (B), де Q – S або O, та W – C



- 25 Синтез піридиніламінів (B), де Q – S або O та W – C, виконують шляхом заміни 5-галогеніду у піридині (I) наявним у продажу тіолом або спиртом (J). Якщо потрібен нітропіридин (I), замінений продукт у подальшому піддають стадії нітровідновлення з одержанням сполуки (B). Слід зазначити, що сполуки (I) є універсальними реагентами для усіх наведених схем, але тільки деякі з них наявні у продажу у вигляді піридиламінів та деякі у вигляді нітропіридинів. Однак наявні у продажу сполуки (I) можна перетворити із застосуванням реакцій аміноокиснювання або нітровідновлення, відомих у галузі, для технологічних послідовностей, опис яких наведено тут та нижче.

#### Схема 5

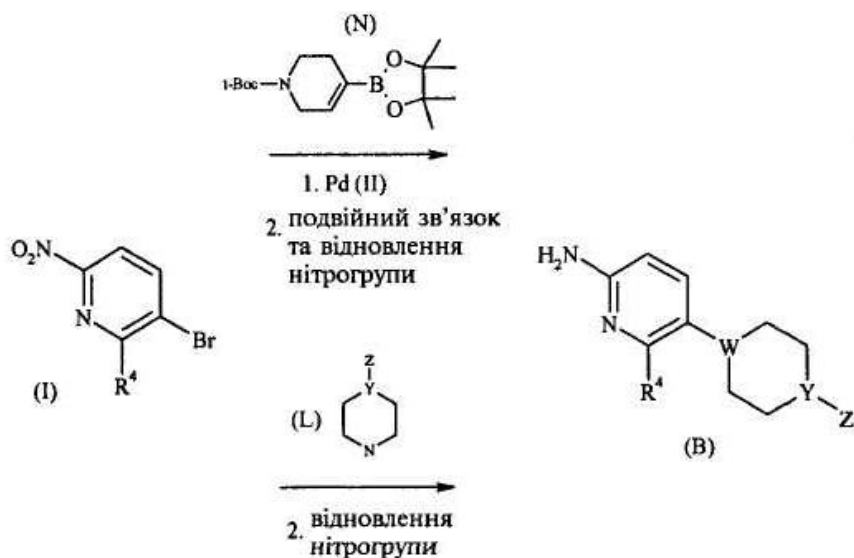
Підготовчий синтез піридиніламінів (В),  
де Q – CH<sub>2</sub>



Синтез піридиніламінів (В), де Q – CH<sub>2</sub> виконують двома шляхами: 1) Наявні у продажу  
5 сполуки карбальдегіди (К) піддають відновлювальному амінуванню вільним аміном (L), після  
чого каталізованим Pd(0) амінуванням замінують піридинбромід літій-1,1,1,3,3,3-  
гексаметилдисилазаном або рідким аміаком та оксидом міді(I). 2) Наявний у продажу 1-  
піперидинкарбонової кислоти, 4-метил-, 1,1-диметилетиловий складний ефір (М) піддають  
10 гідроборуванню, з подальшим каталізованим Pd (II) сполученням з піридиламіном (I).

Схема 6

Підготовчий синтез піридиніламінів (В),  
де Q – безпосередній зв'язок



Синтез піридиніламінів (В), де Q – безпосередній зв'язок, виконують двома шляхами: 1)  
15 Наявний у продажу 1(2Н)-піридинкарбонової кислоти, 3,6-дигідро-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-  
діоксаборолан-2-іл)-, 1,1-диметилетиловий складний ефір (N) піддають каталізованому  
паладієм (II) сполученню з нітропіридином (I) з подальшим відновленням як нітрогрупи, так і  
подвійного зв'язка. 2) Бромід у нітропіридині (I) замінують вільним аміном (L), після чого  
20 відновлюють нітрогрупу.

Підготовчий синтез 1

Трет-бутиловий складний ефір 4-(6-амінопіридин-3-ілсульфаніл)піперидин-1-карбонової  
кислоти

Додають безводний толуол (6,06 мл) до суміші 2,9-диметил-1,10-фенантроліну (76,52 мг), йодид міді(І) (69,27 мг), трет-бутилат натрію (475,59 мг), трет-бутиловий складний ефір 4-меркаптопіперидин-1-карбонової кислоти (583,5 мг), магній (49,10 мг) та 2-аміно-5-йодпіридин (550 мг). Барботують азот через суміш з обробкою ультразвуком, та струшують утворену суспензію при 110 °С в запайній трубці протягом 24 год. Охолоджують, та фільтрують через целіт. Промивають толуолом, та видаляють розчинник у вакуумі. Додають суміш гексан/ЕА (1/1), фільтрують через шар целіту/силікагелю, та промивають двічі сумішшю гексан/ЕА (1/1), а потім – ЕА. Видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю гексан/ЕА (50-75 %), та одержують 630 мг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=310 (M+H)<sup>+</sup>.

Підготовчий синтез 2

5-фтор-2-нітропіридин

До сірчаної кислоти (46 мл) при 0 °С додають 25 % розчин пероксиду водню (26,98 мл) на відкритому повітрі. Через 5 хв додають краплями холодний розчин 2-аміно-5-фторпіридину (9 г) у концентрованій сірчаній кислоті (46 мл) через краплинну лійку. Одержаний темний розчин, який мав температуру 0 °С, витримують до досягнення кімнатної температури при перемішуванні на бані протягом ночі. Виливають у 200 мл охолодженої льодом води, та екстрагують DCM. Промивають об'єднані органічні шари 5 % водним розчином бісульфіту натрію, та сушать безводним сульфатом натрію. Видаляють розчинник у вакуумі, та очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи DCM, та одержують 7,5 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=143 (M+H)<sup>+</sup>.

Зазначену нижче сполуку одержують по суті за методикою, описаною для 5-фтор-2-нітропіридину, із застосуванням відповідного аміну:

| Підготовчий синтез | Сполука                       | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|-------------------------------|---|
| 3                  | 3-бром-2-метил-6-нітропіридин | 218   |

Підготовчий синтез 4

1-ізопропіл-4-(2-метил-6-нітропіридин-3-іл)піперазин

Перемішують 3-бром-2-метил-6-нітропіридин (2,46 г), 1-ізопропілпіперазин (2,74 г), йодид тетра-н-бутиламонію (418,69 мг) та карбонат калію (1,72 г) у диметилсульфоксиді (DMSO, 20 мл) при 65 °С протягом ночі. Додають ЕА та воду, розділяють одержані фази, сушать органічний шар сульфатом магнію, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають через картридж із сильною катіонообмінною смолою, елюючи метанолом, а потім сумішшю метанолу та 2 н розчину NH<sub>3</sub>, та одержують 2,58 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=265 (M+H)<sup>+</sup>.

Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для 1-ізопропіл-4-(2-метил-6-нітропіридин-3-іл)піперазину, із застосуванням відповідної похідної бром:

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|---|---|
| 5                  | трет-бутиловий складний ефір (2'-метил-6'-нітро-3,4,5,6-тетрагідро-2H-[1,3']біпіридиніл-4-іл)карбамінової кислоти | 337   |
| 6                  | трет-бутиловий складний ефір (6'-нітро-3,4,5,6-тетрагідро-2H-[1,3']біпіридиніл-4-іл)карбамінової кислоти          | 323   |

Підготовчий синтез 7

5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іламін

Перемішують 1-ізопропіл-4-(2-метил-6-нітропіридин-3-іл)піперазин (2,52 г) та 10 % розчин паладію на вугіллі (600 мг) у метанолі (38 мл) та ЕА (38 мл) у атмосфері H<sub>2</sub>, створюваній еластичною камерою, протягом ночі. Фільтрують через шар целіту, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол (0-10 %), та одержують 2,23 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=143 (M+H)<sup>+</sup>.

Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для 5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іламіну, із застосуванням відповідної нітропохідної:

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|---|---|
| 8                  | трет-бутиловий складний ефір (6'-аміно-2'-метил-3,4,5,6-тетрагідро-2H-[1,3']біпіридиніл-4-іл)карбамінової кислоти | 307   |
| 9                  | трет-бутиловий складний ефір (6'-аміно-3,4,5,6-тетрагідро-2H-[1,3']біпіридиніл-4-іл)карбамінової кислоти          | 293   |

## Підготовчий синтез 10

Трет-бутиловий складний ефір 4-(6-нітропіридин-3-ілокси)піперидин-1-карбонової кислоти

- 5 Додають трет-бутилат калію (4,84 г) до розчину трет-бутил-4-гідрокси-1-піперидинкарбоксилату (8,76 г) у диметилацетаміді (DMA, 39 мл) при 0 °C у атмосфері азоту. Перемішують протягом 1 год., та додають краплями розчин 5-фтор-2-нітропіридину (5 г) у DMA (78 мл). Перемішують реакційну суміш при кімнатній температурі протягом ночі. Додають воду, та витримують протягом 1 год. Фільтрують, промивають водою. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/EA (0-15 %), та одержують 5,65 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=324 (M+H)<sup>+</sup>.

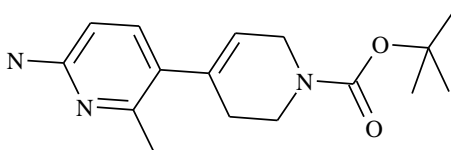
## Підготовчий синтез 11

Трет-бутиловий складний ефір 4-(6-амінопіридин-3-ілокси)піперидин-1-карбонової кислоти

- 15 Додають 10 % розчин паладію на вугіллі (0,6 г) до суспензії трет-бутилового складного ефіру 4-(6-нітропіридин-3-ілокси)піперидин-1-карбонової кислоти (5,65 г) у суміші тетрагідрофурану (THF) та метанолу (30/30 мл/мл). Гідрують у апараті Парра (Parr) при 2 атм (0,2 МПа) протягом ночі. Фільтрують через шар целіту, промивають DCM та метанолом. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол (10 %)/аміак (1 %), та одержують 5 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=294 (M+H)<sup>+</sup>.

## Підготовчий синтез 12

Трет-бутиловий складний ефір 6-аміно-2-метил-3',6'-дигідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти



- 25 Барботують азот через суміш трет-бутилового складного ефіру 4-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-3,6-дигідро-2H-піридин-1-карбонової кислоти (2,46 г) та 5-бром-6-метилпіридин-2-іламіну (1,49 г) у 1,4-діоксані (31,82 мл) протягом 5 хв, після чого додають N-гідрат ортофосфату калію (5,07 г), ацетат паладію (35,72 мг), дициклогексил-(2',6'-диметоксибіфеніл-2-іл)фосфан (134,69 мг), воду (7,96 мл), та перемішують при 90°C протягом 3 год. Розводять DCM, та промивають водою. Сушать сульфатом натрію, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/етанол 5 %/NH<sub>3</sub> 0,1 %, після чого очищають через картридж із сильною іонообмінною смолою (SCX), елюючи метанолом, а потім сумішшю метанол-NH<sub>3</sub> 2 М, та одержують 2,12 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=292 (M+H)<sup>+</sup>.

## Підготовчий синтез 13

Трет-бутиловий складний ефір 6-аміно-2-метил-3',4',5',6'-тетрагідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти

- 35 Перемішують суміш трет-бутилового складного ефіру 6-аміно-2-метил-3',6'-дигідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти (2,12 г) та 10 % розчину паладію на вугіллі (330 мг) у метанолі (29,30 мл) (у вигляді вологої пасти) у атмосфері H<sub>2</sub> (45 фунт на кв. дюйм = 310,05 МПа) протягом 48 год. Фільтрують через шар целіту, видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 2,07 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=292 (M+H)<sup>+</sup>.

## Підготовчий синтез 14

Трет-бутиловий складний ефір 6-нітро-3',6'-дигідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти

- 45 Барботують азот через суміш трет-бутилового складного ефіру 4-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-3,6-дигідро-2H-піридин-1-карбонової кислоти (19,6 г), 5-бром-2-нітропіридину (12,87 г), 2М розчину карбонату натрію у воді (63,39 мл) та хлориду біс(трифенілфосфін)паладію(II) (4,45 г) у 1,4-діоксані (316,94 мл) протягом 5 хв, та перемішують суміш при 80°C протягом 5 год. Розводять DCM, та промивають водою. Сушать сульфатом

магнію, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю DCM/EA (0-40 %), та одержують 8,72 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=306 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Підготовчий синтез 15

5 Трет-бутиловий складний ефір 6-аміно-3',4',5',6'-тетрагідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти

Розчиняють трет-бутиловий складний ефір 6-нітро-3',6'-дигідро-2'H-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти (1,89 г) у етанолі (123,80 мл). Гідрують у присутності паладію на вугіллі (протоковий гідрогенізаційний реактор H-Cube, 70 бар = 7 МПа, 50°C, 1 мл/хв), та одержують 10 1,72 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=278 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Підготовчий синтез 16

Трет-бутиловий складний ефір 4-(6-амінопіридин-3-ілметил)піперидин-1-карбонової кислоти

15 Перемішують протягом 5 хв трет-бутиловий складний ефір 4-метилєн-піперидин-1-карбонової кислоти (5,10 г) у атмосфері азоту, та додають 0,5 М розчин 9-борабіцикло[3,3,1]нонану у THF (77,49 мл). Перемішують при 75 °C у атмосфері азоту протягом 1 год. Охолоджують, додають 2-аміно-5-бромпіридин (3,8 г), карбонат калію (3,87 г), хлорид 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен)паладію(II) (538,10 мг) та знегажену суміш DMF (47,83 мл) та води (4,78 мл). Перемішують при 60 °C протягом 4 год., після чого при кімнатній температурі протягом уїк-енду. Додають воду та EA. Відділяють та екстрагують водний шар етилацетатом. 20 Об'єднують одержані органічні шари, сушать сульфатом натрію, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи градієнтом від DCM/метанол (1 %)/аміак (0,1 %) до DCM/метанол (3 %)/аміак (0,3 %). Розтирають одержаний залишок з етилацетатом, та одержують 1,85 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=292 (M+H)<sup>+</sup>.

25 Зазначену нижче сполуку одержують по суті за методикою, описаною для трет-бутилового складного ефіру 4-(6-амінопіридин-3-ілметил)піперидин-1-карбонової кислоти, із застосуванням відповідного похідного бром:

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|---|---|
| 17                 | трет-бутиловий складний ефір 4-(6-аміно-2-метилпіридин-3-ілметил)піперидин-1-карбонової кислоти | 306   |

#### 30 Підготовчий синтез 18

1-(6-бромпіридин-3-ілметил)-4-етилпіперазин

Додають нерозведений 1-етилпіперазин (221,44 мл) до суміші 6-бромпіридин-3-карбальдегіду (300 г) та DCM (5000 мл). Потім порціями додають триацетоксиборгідрид натрію (372,09 г), та перемішують при кімнатній температурі протягом 12 год. Додають DCM (1000 мл) 35 та 2 н водний розчин гідроксиду натрію (1500 мл). Відділяють одержані шари, та екстрагують двічі водний шар дихлорметаном (600 мл). Об'єднують одержані органічні шари, видаляють розчинник у вакуумі, додають EA, випарюють, та одержують 451,3 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=285 (M+H)<sup>+</sup>.

40 Зазначену нижче сполуку одержують по суті за методикою, описаною для 1-(6-бромпіридин-3-ілметил)-4-етилпіперазину, із застосуванням відповідного аміну:

| Підготовчий синтез | Сполука  | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|--|---|
| 19                 | трет-бутиловий складний ефір 4-(6-бромпіридин-3-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти | 357   |

#### Підготовчий синтез 20

5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іламін

45 Повільно додають 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазан літію (1055 мл) до знегаженої суміші 1-(6-бромпіридин-3-ілметил)-4-етилпіперазину (250 г), дициклогексилфосфіно)біфенілу (18,50 г), трис(дифенілїденацетон)дипаладію (24,17 г) та THF (250 мл) при 50°C. Нагрівають одержану суміш до 65°C, і витримують при цій температурі протягом ночі. Охолоджують до 37°C, та додають воду (500 мл). Видаляють половину розчинника у вакуумі, та додають DCM (2,5 л). 50 Фільтрують через шар целіту, та видаляють частину розчинника. Додають метанол (300 мл) та

метил-трет-бутиловий ефір (MtBE, 600 мл) до одержаної суміші, та охолоджують на льодяній бані. Потім додають 2 М розчин хлористоводневої кислоти в етиловому ефірі (800 мл) та 32 % водний розчин хлористоводневої кислоти (100 мл). Видаляють органічний шар, та додають 2 М водний розчин гідроксиду натрію (2500 мл). Екстрагують водну фазу тричі дихлорметаном, та

5

видаляють розчинник у вакуумі. Розчиняють у 90 мл толуолу при 50°C до завершення розчинення, після чого додають 80 мл MtBE. Перемишують протягом ночі при кімнатній температурі. Знову додають MtBE (100 мл) для завершення осадження. Відфільтровують одержану тверду речовину, сушать, та одержують 108,24 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=221 (M+H)<sup>+</sup>.

10

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|---|---|
| 21                 | трет-бутиловий складний ефір 4-(6-амінопіридин-3-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти | 293   |

15

Підготовчий синтез 22

2,4-дибром-1-нітробензол

Додають краплями димлячу азотну кислоту (101,40 мл) до розчину 1,3-дибромбензолу (102,51 мл) у концентрованій сірчаній кислоті (322,79 мл) та воді (62,39 мл) при 0°C. Нагрівають до кімнатної температури, та перемишують протягом 12 год. Виливають реакційну суміш у охолоджену льодом воду (1500 мл). Відфільтровують одержану жовту речовину у вакуумі, сушать, та одержують 178,46 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=281 (M+H)<sup>+</sup>.

20

Підготовчий синтез 23

(5-бром-2-нітрофеніл)циклопентиламін

Додають циклопентанамін (32 мл) до розчину 2,4-дибром-1-нітробензолу (20 г) у 1-бутанолі (160 мл). Нагрівають одержану суміш до 100°C, та витримують протягом ночі. Видаляють розчинник у вакуумі, додають воду, та екстрагують етилацетатом. Промивають органічний шар послідовно водним насиченим розчином бікарбонату натрію та водою. Сушать сульфатом магнію, видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 22 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=286 (M+H)<sup>+</sup>.

25

30

Підготовчий синтез 24

4-бром-N2-циклопентилбензол-1,2-діамін

Додають дитіоніт натрію (107,47 г) до розчину 5-бром-2-нітро-феніл)циклопентиламіну (22 г), THF (150 мл), води (150 мл) та гідроксиду амонію (30 мл). Перемишують одержану суміш при кімнатній температурі протягом ночі. Екстрагують двічі етилацетатом, сушать сульфатом магнію, видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 14,80 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=256 (M+H)<sup>+</sup>.

35

Підготовчий синтез 25

6-бром-1-циклопентил-2-метил-1H-бензимидазол

Нагрівають суміш 4-бром-N2-циклопентилбензол-1,2-діаміну (10,6 г), триетилортоацетату (9,5 мл) та оцтової кислоти (6,3 мл) до 100°C, та витримують протягом 2,5 год. Розводять дихлорметаном, та виливають у водний насичений розчин бікарбонату натрію. Сушать сульфатом натрію, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/етанол-10 % NH<sub>3</sub> (0-3 %), та одержують 10,67 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=280 (M+H)<sup>+</sup>.

40

45

Підготовчий синтез 26

N-ізопропілацетамід

Додають TEA (23,58 мл) до розчину 2-пропанаміну (10 г) у DCM (100 мл) при 0°C. Потім обережно додають краплями ангідрид оцтової кислоти (16,15 мл). Перемишують при кімнатній температурі протягом ночі. Видаляють розчинник у вакуумі, розводять етиловим ефіром, та відфільтровують одержану тверду речовину. Видаляють розчинник у вакуумі. Розводять одержане масло етиловим ефіром, додають карбонат калію, та перемишують протягом ночі при кімнатній температурі. Відфільтровують одержану тверду речовину, видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 15,62 г вказаної в заголовку сполуки. ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

50

55

Зазначені нижче аміді одержують по суті за методикою, описаною для N-ізопропілацетаміду, із застосуванням відповідного аміну:

| Підготовчий синтез | Сполука                    |
|--------------------|----------------------------|
| 27                 | N-циклопропілацетамід      |
| 28                 | N-циклопропілметилацетамід |
| 29                 | N-циклопентил-ацетамід     |

## Підготовчий синтез 30

N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-ізопропілацетамідин

- 5 Додають TEA (10,05 мл) до суміші 4-бром-2,6-дифторфеніламіну (10,0 г), N-ізопропілацетаміду (9,73 г), фосфорилхлориду (6,70 мл) у толуолі (150 мл). Нагрівають одержану суміш до кипіння та кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 3 год. Охолюють одержану суміш, та видаляють розчинник у вакуумі. Розчиняють неочищений залишок у DCM, промивають водним насиченим розчином бікарбонату натрію декілька разів до
- 10 видалення всіх слідів кислоти. Сушать сульфатом натрію, видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 14 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=292 (M+H)<sup>+</sup>.

Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-ізопропілацетамідину, із застосуванням відповідного ацетаміду:

| Підготовчий синтез | Сполука  | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|--|---|
| 31                 | N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-циклопропілацетамідин      | 290   |
| 32                 | N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-циклопропілметилацетамідин | 304   |
| 33                 | N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-циклопентилацетамідин      | 318   |

15

## Підготовчий синтез 34

6-бром-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензимидазол

- 20 Додають трет-бутилат калію (811,43 мг) до розчину N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-ізопропілацетамідину (2 г) у N-метилформаміді (20 мл). Нагрівають одержану суміш до 100°C, та витримують протягом 2 год. Охолюють до кімнатної температури, додають DCM (150 мл), промивають тричі насиченим водним розчином хлориду натрію (розсіл, 300 мл), сушать сульфатом магнію, та видаляють розчинник у вакуумі. Додають гексан, та струшують під час
- 25 обробки ультразвуком протягом декількох хвилин. Відфільтровують одержану тверду речовину, повторюють двічі додання гексану та фільтрування, й одержують 1,86 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=272 (M+H)<sup>+</sup>.

Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для 6-бром-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензимидазолу, із застосуванням відповідного ацетамідину:

| Підготовчий синтез | Сполука  | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|--|---|
| 35                 | 6-бром-1-циклопропіл-4-фтор-2-метил-1H-бензимидазол      | 270   |
| 36                 | 6-бром-1-циклопропілметил-4-фтор-2-метил-1H-бензимидазол | 284   |
| 37                 | 6-бром-1-циклопентил-4-фтор-2-метил-1H-бензимидазол      | 298   |

30

## Підготовчий синтез 38

4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1H-бензимидазол

- 35 Барботують азот через суміш 6-бром-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензимидазолу (30,0 г), біс(пінаколато)дибору (42,15 г), трициклогексилфосфіну (5,43 г), ацетату калію (32,58 г) та DMSO (200 мл). Додають ацетат паладію (2,8 г), та нагрівають у заздалегідь нагрітій масляній бані до 90°C, та витримують протягом 1 год. Розводять етилацетатом (200 мл), та фільтрують через шар целіту. Промивають одержану суміш розсолем (100 мл), сушать сульфатом натрію, та видаляють розчинник у вакуумі. Розтирають з гексаном, відфільтровують одержану тверду речовину, та одержують 27 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=319 (M+H)<sup>+</sup>.

- 40 Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для 4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1H-бензимидазолу, із застосуванням відповідних похідних 6-бромбензимидазолу:



| Підготовчий синтез | Сполука  | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|--------------------|--|----------------------|
| 39                 | 1-циклопропіл-4-фтор-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1Н-бензимидазол      | 317                  |
| 40                 | 1-циклопентил-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1Н-бензимидазол             | 327                  |
| 41                 | 1-циклопропілметил-4-фтор-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1Н-бензимидазол | 331                  |
| 42                 | 1-циклопентил-4-фтор-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1Н-бензимидазол      | 345                  |

## Підготовчий синтез 43

6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1Н-бензимидазол

- Барботують азот через суміш 2,4-дихлор-5-фторпіримідину (12,7 г), хлориду біс(трифенілфосфін)паладію(II) (4,9 г), 2 М розчину карбонату натрію у воді (103,7 мл) та 1,2-диметоксітан (120 мл). Нагрівають у заздалегідь нагрітій масляній бані до 80°C, та додають краплями розчин 4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1Н-бензимидазолу (22 г) у 1,2-диметоксітані (200 мл). Перемішують одержану суміш до 84°C, та витримують протягом 1 год. Охолоджують до кімнатної температури, додають ЕА (800 мл), та промивають двічі розсолем (100 мл). Сушать сульфатом магнію, та видаляють розчинник у вакуумі. Розтирають з ацетонітрилом, та одержують 14,4 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=323 (M+H)<sup>+</sup>.

- Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1Н-бензимидазолу, із застосуванням відповідних похідних дихлорпіримідину та борату:

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|--------------------|---|----------------------|
| 44                 | 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-1-циклопропіл-4-фтор-2-метил-1Н-бензимидазол      | 321                  |
| 45                 | 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-1-циклопентил-2-метил-1Н-бензимидазол             | 331                  |
| 46                 | 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-1-циклопропілметил-4-фтор-2-метил-1Н-бензимидазол | 335                  |
| 47                 | 6-(2-хлор-піримідин-4-іл)-1-циклопентил-4-фтор-2-метил-1Н-бензимидазол            | 331                  |
| 48                 | 6-(2-хлор-піримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1Н-бензимидазол              | 305                  |

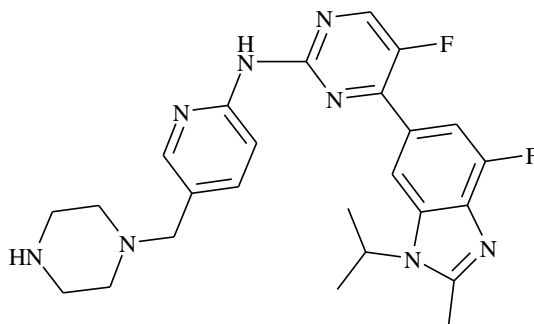
- Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною нижче для [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну, із застосуванням відповідних похідних аміну та хлорпіримідину:

| Підготовчий синтез | Сполука  | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|--------------------|--|----------------------|
| 49                 | трет-бутиловий складний ефір 4-{6-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]піридин-3-ілметил}піперазин-1-карбонової кислоти            | 579                  |
| 50                 | трет-бутиловий складний ефір 4-{6-[4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іламіно]піридин-3-ілметил}піперидин-1-карбонової кислоти          | 576                  |
| 51                 | трет-бутиловий складний ефір 4-{6-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]-2-метилпіридин-3-ілметил}піперидин-1-карбонової кислоти    | 592                  |
| 52                 | трет-бутиловий складний ефір 6-[4-(3-циклопентил-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іламіно]-3',4',5',6'-тетрагідро-2'Н-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти | 572                  |

| Підготовчий синтез | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|--------------------|---|---|
| 53                 | трет-бутиловий складний ефір 6-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]-2-метил-3',4',5',6'-тетрагідро-2'Н-[3,4']біпіридиніл-1'-карбонової кислоти   | 578   |
| 54                 | трет-бутиловий складний ефір 4-{6-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]піридин-3-ілокси}піперидин-1-карбонової кислоти                            | 580   |
| 55                 | трет-бутиловий складний ефір {6'-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]-2'-метил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4-іл}карбамінової кислоти | 593   |
| 56                 | трет-бутиловий складний ефір {6'-[4-(3-циклопентил-7-фтор-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4-іл}карбамінової кислоти               | 587   |
| 57                 | трет-бутиловий складний ефір 4-{6-[4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]піридин-3-ілсульфаніл}піперидин-1-карбонової кислоти                              | 578   |

Підготовчий синтез 58

[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-(5-піперазин-1-ілметилпіридин-2-іл)амін



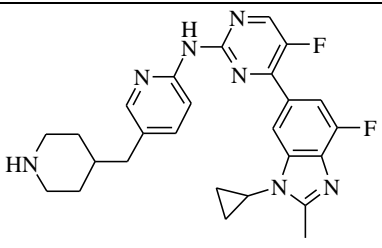
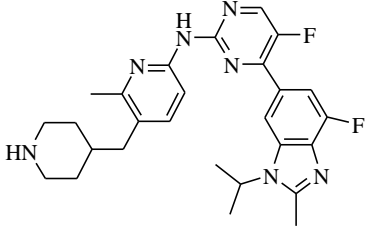
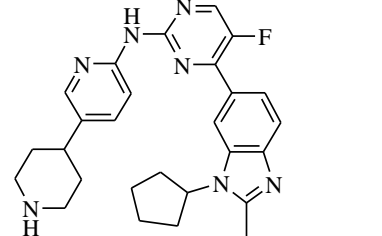
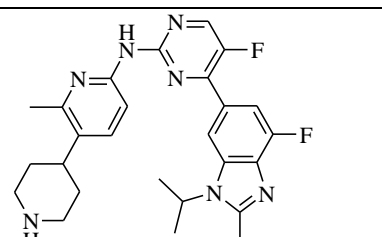
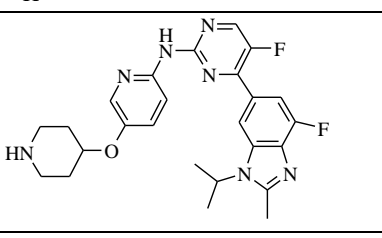
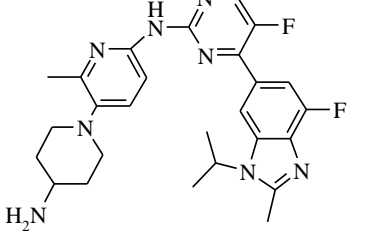
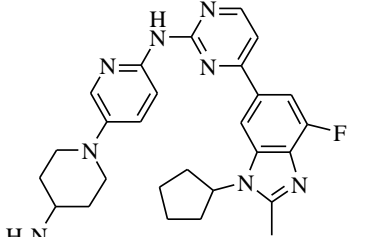
5

До суміші трет-бутилового складного ефіру 4-{6-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іламіно]піридин-3-ілметил}піперазин-1-карбонової кислоти (150 мг) у DCM (10 мл) та метанолі (10 мл) додають 4М розчин хлористого водню у діоксані (194 мкл). Перемішують 10 хв, та видаляють розчинник у вакуумі. Очищують через картридж із сильною катіонообмінною смолою (SCX), елюючи метанолом, потім сумішшю метанол-NH<sub>3</sub> 2М, після чого хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол-NH<sub>3</sub> 2М (3 %), та одержують 120 мг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=479 (M+H)<sup>+</sup>.

10

Зазначені нижче проміжні сполуки одержують по суті за методикою, описаною для [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-(5-піперазин-1-ілметилпіридин-2-іл)аміну:

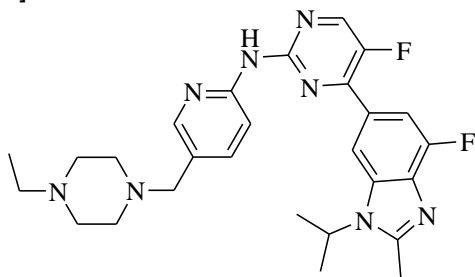
15

| Підготовчий синтез | Структура   | Назва сполуки  | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|--------------------|---|--|----------------------|
| 59                 |    | [4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-(5-піперидин-4-ілметилпіридин-2-іл)амін                         | 476                  |
| 60                 |    | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-(6-метил-5-піперидин-4-ілметилпіридин-2-іл)амін                   | 492                  |
| 61                 |   | [4-(3-циклопентил-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-(1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4']біпіридиніл-6-іл)амін              | 472                  |
| 62                 |  | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-(2-метил-1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4']біпіридиніл-6-іл)амін | 478                  |
| 63                 |  | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(піперидин-4-ілокси)піридин-2-іл]амін                          | 480                  |
| 64                 |  | N6'-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-2'-метил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діамін  | 493                  |
| 65                 |  | N6'-[4-(3-циклопентил-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діамін                | 487                  |

| Підготовчий синтез | Структура | Назва сполуки   | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|--------------------|-----------|---|----------------------|
| 66                 |           | [4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(піперидин-4-ілсульфаніл)піридин-2-іл]амін | 478                  |

## Приклад 1

[5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін



5

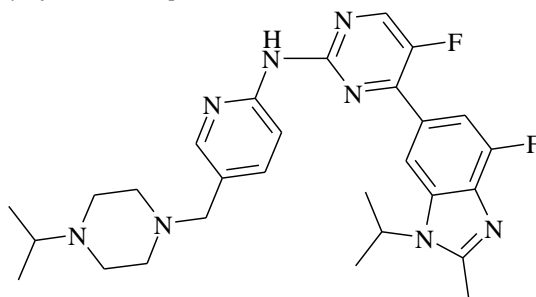
Барботують азот через суміш 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1Н-бензімідазолу (15,9 г), 5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іламіну (10,85 г), карбонату цезію (32,10 г), трис(добензиліденацетон)дипаладію (1,82 г), 4,5-біс(дифенілфосфіно)-9,9-диметилксантену (2,35 г) у 1,4-діоксані (197,06 мл). Нагрівають одержану суміш у заздалегідь нагрітій масляній бані до 110°C, та витримують протягом 2 год. Охолюють до кімнатної температури, розводять дихлорметаном, та фільтрують через шар целіту. Видаляють розчинник у вакуумі, очищують хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол (2 %), а потім сумішшю DCM/метанол-NH<sub>3</sub> 2 М 2 %, та одержують 22,11 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=507 (M+H)<sup>+</sup>.

15

Сполуки наведених нижче прикладів одержують по суті за методикою, описаною для [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну, із застосуванням відповідних похідних аміну та хлорпіримідину:

| Приклад | Структура | Назва сполуки   | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|---------|-----------|---|----------------------|
| 2       |           | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іл]амін        | 521                  |
| 3       |           | [4-(3-циклопропілметил-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іл]амін | 533                  |

Приклад 4  
[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]амін



- 5 Додають триацетоксиборгідрид натрію (299,9 мг) до суміші [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-(5-піперазин-1-ілметилпіридин-2-іл)аміну (130 мг), ацетону (31,6 мкл), 1,2-дихлоретану (9 мл) та оцтової кислоти (16,3 мкл). Нагрівають до 60°C, та витримують протягом 1 год. Видаляють розчинник у вакуумі. Очищають через картридж із сильною катіонообмінною смолою (SCX), елюючи метанолом, а потім – сумішшю метанол-NH<sub>3</sub> 2 М, після чого очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол-NH<sub>3</sub> 2 М (3 %), та одержують 115 мг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=521 (M+H)<sup>+</sup>.

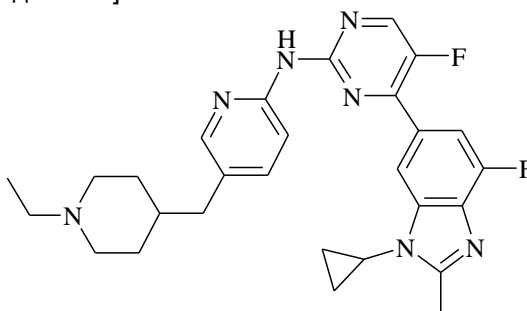
- 10 Сполуки наведених нижче прикладів одержують по суті за методикою, описаною для [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]аміну, із застосуванням відповідних амінів:

| Приклад | Структура | Назва сполуки  | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|---------|-----------|--|---|
| 5       |           | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[6-метил-5-(1-метилпіперидин-4-ілметил)піридин-2-іл]амін          | 506   |
| 6       |           | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(1-ізопропіл-піперидин-4-ілметил)-6-метилпіридин-2-іл]амін     | 534   |
| 7       |           | [4-(3-циклопентил-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-(1'-ізопропіл-1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4']біпіридиніл-6-іл)амін | 514   |

| Приклад | Структура | Назва сполуки   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|---------|-----------|---|---|
| 8       |           | [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(1-ізопропіл-піперидин-4-ілокси)піридин-2-іл]амін | 522   |

## Приклад 9

[4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-(1-етилпіперидин-4-ілметил)піридин-2-іл]амін



5

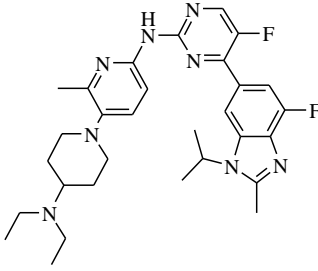
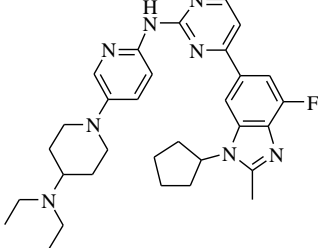
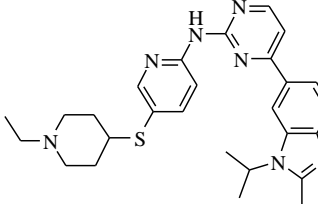
Додають триацетоксиборгідрид натрію (720 мг) до суміші [4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-піперидин-4-ілметилпіридин-2-іл]аміну (110 мг), 1,2-дихлоретану (1,14 мл) та оцтової кислоти (2709 мкл). Нагрівають до 60°C, та витримують протягом 1 год. Видаляють розчинник у вакуумі. Очищають через картридж із сильною катіонообмінною смолою (SCX), елюючи метанолом, а потім сумішшю метанол-NH<sub>3</sub> 2М, після чого очищають хроматографією на колонці із силікагелем, елюючи сумішшю DCM/метанол-NH<sub>3</sub> 2М (3 %), та одержують 80 мг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=504 (M+H)<sup>+</sup>.

10

Сполуки наведених нижче прикладів одержують по суті за методикою, описаною для [4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-(1-етилпіперидин-4-ілметил)піридин-2-іл]аміну, із застосуванням відповідних амінів:

15

| Приклад | Структура | Назва сполуки   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|---------|-----------|---|---|
| 10      |           | [5-(1-етилпіперидин-4-ілметил)-6-метилпіридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін                  | 520   |
| 11      |           | (1'-етил-2-метил-1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4]біпіридиніл-6-іл)-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін | 506   |
| 12      |           | [5-(1-етилпіперидин-4-ілокси)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін                           | 508   |

| Приклад | Структура  | Назва сполуки  | MS (ES <sup>+</sup> ):<br>m/z (M+H) <sup>+</sup> |
|---------|--|--|--|
| 13      |   | N <sup>4</sup> ,N <sup>4</sup> -діетил-N6'-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-2'-метил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діамін | 549  |
| 14      |   | N6'-[4-(3-циклопентил-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-N4,N4-діетил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діамін   | 543  |
| 15      |  | [5-(1-етилпіперидин-4-ілсульфаніл)піридин-2-іл]-[4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін  | 506  |

## Приклад 16

метансульфонат [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну

- 5 Додають метансульфонову кислоту (63,59 мл) до розчину [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну (17,3 г) у суміші DCM (100 мл) та метанолу (100 мл). Перемішують одержаний розчин протягом 1 год., та видаляють розчинник у вакуумі. Розтирають з MtBE, відфільтровують одержану тверду речовину, та одержують 20,4 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=507 (M+H)<sup>+</sup>.

10 Сполуки наведених нижче прикладів одержують по суті за методикою, описаною для метансульфонату [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну:

| Приклад | Сполука   | MS (ES <sup>+</sup> ): m/z<br>(M+H) <sup>+</sup> |
|---------|---|--|
| 17      | метансульфонат [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іл]аміну        | 521  |
| 18      | Метансульфонат [4-(3-циклопропілметил-7-фтор-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-іл)-6-метилпіридин-2-іл]аміну | 533  |
| 19      | метансульфонат [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(4-ізопропілпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]аміну           | 521  |
| 20      | метансульфонат [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[6-метил-5-(1-метилпіперидин-4-ілметил)піридин-2-іл]аміну       | 506  |
| 21      | метансульфонат [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензімідазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(1-ізопропіл-піперидин-4-ілметил)-6-метилпіридин-2-іл]аміну  | 534  |

| Приклад | Сполука  | MS (ES+): m/z (M+H)+ |
|---------|--|----------------------|
| 22      | метансульфонат [4-(3-циклопентил-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-(1'-ізопропіл-1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4']біпіридиніл-6-іл)аміну             | 514                  |
| 23      | метансульфонат [5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-[5-(1-ізопропіл-піперидин-4-ілокси)піридин-2-іл]аміну                          | 522                  |
| 24      | метансульфонат [4-(3-циклопропіл-7-фтор-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)-5-фторпіримідин-2-іл]-[5-(1-етилпіперидин-4-ілметил)піридин-2-іл]аміну                             | 504                  |
| 25      | метансульфонат [5-(1-етилпіперидин-4-ілметил)-6-метилпіридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну                       | 520                  |
| 26      | Метансульфонат (1'-етил-2-метил-1',2',3',4',5',6'-гексагідро-[3,4']біпіридиніл-6-іл)-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну     | 506                  |
| 27      | метансульфонат [5-(1-етилпіперидин-4-ілокси)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну                                | 508                  |
| 28      | метансульфонат N4,N4-діетил-N6'-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-2'-метил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діаміну | 549                  |
| 29      | метансульфонат N6'-[4-(3-циклопентил-7-фтор-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]-N4,N4-діетил-3,4,5,6-тетрагідро-2Н-[1,3']біпіридиніл-4,6'-діаміну               | 543                  |
| 30      | метансульфонат [5-(1-етилпіперидин-4-ілсульфаніл)піридин-2-іл]-[4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну                                  | 506                  |

## Приклад 31

[5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін

## 5 Кристалічна форма I

Змішують 102,1 мг аморфного [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну з 2 мл ацетону. Виділяють осаджену тверду речовину шляхом вакуумного фільтрування, одержуючи світло-жовтий осад, та сушать безпосередньо у фільтрувальному пристрої протягом 30 хв, одержуючи 72,1 мг

10 твердої речовини. Завантажують одержану тверду речовину у нагріту до 100°C вакуумну сушильну шафу та витримують протягом 3 год.

Репрезентативні піки рентгенівської дифракції форми I наведені у Таблиці 1.

## Приклад 32

[5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін

## 15 Кристалічна форма III

Змішують 208 мг аморфного [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну з 4 мл ацетону. Перемішують утворену суспензію протягом 2 год. при 60°C при 1000 об/хв, після чого виділяють утворену

20 тверду речовину шляхом вакуумного фільтрування, одержуючи світло-жовтий осад. Сушать осад на місці у фільтрувальному пристрої протягом 30 хв, одержуючи 112 мг твердої речовини (вихід 54 %). Завантажують у нагріту до 80°C вакуумну сушильну шафу та витримують протягом 3 год.

Репрезентативні піки рентгенівської дифракції форми III наведені у Таблиці 2. Положення одержаних піків перевіряли із застосуванням зовнішнього стандарту.

## Порошкова рентгенографія

Порошкові рентгенограми кристалів одержують за допомогою рентгенівського дифрактометра Bruker D8 Advance, спорядженого джерелом випромінювання CuK $\alpha$  ( $\lambda=1,54056$  Å) та детектором Vantec (50 кВ, 40 мА). Кожен зразок сканують у межах 4-40° у напрямку 2 $\theta$  з величиною кроку 2 $\theta$ , 0,02°, швидкістю сканування 9,0 с/крок, 1 мм дифузornoю та вхідною діафрагмами та 0,1 мм діафрагмою детектора. Сухий порошок завантажують до завантажувального зверху тримача зразка з вирізом, і гладеньку поверхню забезпечують за допомогою предметного скла. Дифрактограми кристалічних форм одержують при температурі



та відносній вологості навколишнього середовища. Фон для кристалів форми III перед визначенням піків видаляють, у той час як для кристалів форми I фон не видаляється.

У галузі кристалографії добре відомо, що, для будь-якої даної кристалічної форми, відносна інтенсивність дифракційних піків може змінюватись унаслідок переважної орієнтації, що є наслідком таких факторів, як морфологія та форма кристалу. При наявності ефектів переважної орієнтації, інтенсивність піків змінюється, але положення характеристичних піків поліморфу залишаються незмінними. Дивись, наприклад, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, 1995, pp. 1843-1844. Окрім того, у галузі кристалографії також добре відомо, що кутове положення піків для будь-якої даної кристалічної форми може дещо різнитись. Наприклад, положення піків може зміщуватись унаслідок зміни температури або вологості, при якій аналізується зразок, зміщення зразка або присутності чи відсутності внутрішнього стандарту. У даному разі, змінність положення піків  $\pm 0,1$  у напрямку  $2\theta$  буде враховувати ці потенційні зміни без перешкоджання безпомилковій ідентифікації вказаної кристалічної форми.

Підтвердження кристалічної форми може робитись на основі будь-якої унікальної комбінації розрізнявальних піків (у градусах  $2\theta$ ), як правило, найбільш визначних піків. Так, одержаний зразок [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну кристалічної форми I характеризується рентгенодифрактограмою із застосуванням джерела випромінення  $\text{CuK}\alpha$  як такий, що має дифракційні піки (значення  $2\theta$ ), вказані у наведеній нижче Таблиці 1, зокрема, що має піки при  $4,51$  у комбінації з одним або декількома піками, вибраними з групи, до складу якої входить  $13,09$ ,  $16,31$  та  $18,82$ , з допуском у  $0,1$  градусу на кути дифракції.

Таблиця 1

Дифракційні піки кристалічної форми I [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну.

| Кут $2\theta$ , градуси | Значення d, ангстрєми | Інтенсивність, % |
|-------------------------|-----------------------|------------------|
| 4,51                    | 19,60                 | 100              |
| 5,89                    | 15,00                 | 4                |
| 8,98                    | 9,84                  | 1,5              |
| 11,20                   | 7,89                  | 2,3              |
| 12,57                   | 7,04                  | 1,9              |
| 13,09                   | 6,76                  | 7                |
| 15,93                   | 5,56                  | 3                |
| 16,31                   | 5,43                  | 4,4              |
| 17,01                   | 5,21                  | 1,9              |
| 18,58                   | 4,77                  | 3,1              |
| 18,82                   | 4,71                  | 3,6              |
| 20,86                   | 4,26                  | 1,5              |
| 21,90                   | 4,06                  | 2,2              |
| 23,12                   | 3,84                  | 2,4              |
| 23,53                   | 3,78                  | 3,7              |
| 26,71                   | 3,33                  | 2,4              |
| 26,85                   | 3,32                  | 2                |

Одержаний зразок [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну кристалічної форми III характеризується рентгенодифрактограмою із застосуванням джерела випромінення  $\text{CuK}\alpha$  як такий, що має дифракційні піки (значення  $2\theta$ ), вказані у наведеній нижче Таблиці 2, зокрема, що має піки при  $21,29$  у комбінації з одним або декількома піками при  $11,54$ ,  $10,91$ , та  $12,13$ , з допуском у  $0,1$  градусу на кути дифракції.

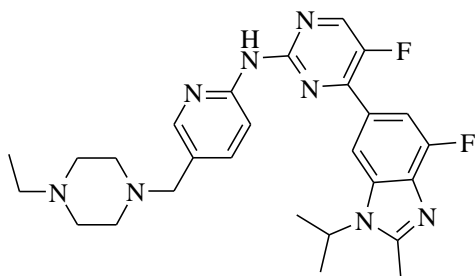
Таблиця 2

Дифракційні піки кристалічної форми III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну.

| Кут $2\theta$ , градуси | Значення d, ангстрєми | Ентенси́вність, % |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| 7,44                    | 11,87                 | 8                 |
| 10,91                   | 8,11                  | 19                |
| 11,54                   | 7,66                  | 38                |
| 12,13                   | 7,29                  | 18                |
| 13,89                   | 6,37                  | 25                |
| 14,91                   | 5,94                  | 20                |
| 15,63                   | 5,67                  | 27                |
| 16,06                   | 5,52                  | 11                |
| 18,59                   | 4,77                  | 21                |
| 18,94                   | 4,68                  | 26                |
| 20,43                   | 4,34                  | 21                |
| 21,29                   | 4,17                  | 100               |
| 21,91                   | 4,05                  | 37                |
| 22,13                   | 4,01                  | 12                |
| 22,45                   | 3,96                  | 8                 |
| 23,12                   | 3,84                  | 6                 |
| 23,42                   | 3,80                  | 9                 |
| 25,95                   | 3,43                  | 17                |
| 29,42                   | 3,03                  | 9                 |

#### Твердотільний $^{13}\text{C}$ ЯМР

- 5 Спектри ЯМР знімали методом кросполяризації/обертання під магнічним кутом (CP/MAS) (твердотільний ЯМР або SSNMR) на ЯМР-спектрометрі Avance III 400 компанії Bruker при  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  частотах 400,131 та 100,623 МГц, відповідно, із застосуванням 4 мм подвійнорезонансного зонда компанії Bruker. Частоту обертання під магнічним кутом (MAS) встановлюють на рівні 5 кГц або 10 кГц за допомогою контролера MAS-IL компанії Bruker; частоту обертання підтримують у межах 2 Гц від встановленої. Для гетероциклічної розв'язки застосовують розв'язку SPINAL64
- 10 при частоті нутації протону 100 кГц. Бічні смуги обертання видаляють за допомогою п'ятиімпульсної послідовності повного пригнічення бічних смуг (TOSS). Тривалість контактування при кросполяризації для передачі намагніченості з протонів на атоми вуглецю встановлюється на рівні 4 мс, а для підвищення ефективності кросполяризації на  $^1\text{H}$  каналі застосовують лінійну зміну потужності з 93,5 кГц до 46,9 кГц. Час збирання даних встановлюють
- 15 на рівні 34 мс, і спектри знімають у 30 кГц спектральному діапазоні з 5 с затримкою повторного циклу. Температуру зразка підтримують на рівні  $297 \pm 1$  К для зведення до мінімуму фрикційного нагрівання, що спричинюється обертанням зразка. Зовнішнім еталоном для  $^{13}\text{C}$  хімічних зсувів ( $\pm 0,05$  млн $^{-1}$ ) є розв'язаний від протонів  $^{13}\text{C}$  пік нерозбавленого (рідкого) тетраметилсилану через високорівневу резонансну частоту адамантину ( $\delta = 29,5$  млн $^{-1}$ ).
- 20 Список піків хімічних зсувів для [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну кристалічної форми III виглядає таким чином:
- $^{13}\text{C}$ -ЯМР:  $\nu(\text{F1})$  (млн $^{-1}$ ) 11,7, 12,9, 20,5, 48,6, 52,5, 59,4, 108,9, 110,0, 112,7, 127,3, 129,4, 135,5, 136,4, 148,8, 150,1, 152,2, 154,5, 156,3.
- 25 Приклад 33  
[5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензимидазол-5-іл)піримідин-2-іл]амін  
Кристалічна форма III – Шлях В



а. 1-(6-бромпіридин-3-ілметил)-4-етилпіперазин

Додають нерозведений 1-етилпіперазин (5,6 кг) до суміші 6-бромпіридин-3-карбальдегіду (8,3 кг) та DCM (186 кг). Потім додають порціями триацетоксиборгідрид натрію (10,9 кг), та перемішують при 20-30°C протягом 12 год. Гасять реакційну суміш у суміші DCM (36 кг) та водного 2 н розчину гідроксиду натрію (46 кг). Розділяють одержані шари, та екстрагують двічі водний шар дихлорметаном (24×2 кг). Об'єднують одержані органічні шари, промивають розсолем (50×2 кг), видаляють розчинник у вакуумі, та одержують 11,5 кг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=285 (M+H)<sup>+</sup>.

б. 5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іламін

Додають рідкий амоній (50,0 кг) до знегаженої суміші 1-(6-бромпіридин-3-ілметил)-4-етилпіперазину (14,2 кг), оксиду міді (200 г) та MeOH (57 кг) при температурі ≤40°C. Нагрівають одержану суміш та витримують при температурі 65-75°C протягом ночі. Охолоджують до 20-30°C, та фільтрують через шар целіту (Celite®). Концентрують одержаний фільтрат, додають DCM (113 кг), доводять рН до 12-14 2 н розчином гідроксиду натрію (23 кг), розділяють одержані фази, промивають органічну фазу дихлорметаном (58×2 кг), та об'єднують одержані органічні шари. Фільтрують одержану суміш через целіт, та концентрують. Розчиняють одержаний залишок у толуолі (9,7 кг), кристалізують шляхом додання MtBE (8,3 кг), та одержують 6,0 кг вказаної в заголовку сполуки. Одержану сполуку очищають перекристалізацією з толуолу. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=221 (M+H)<sup>+</sup>.

с. N-ізопропілацетамід

Додають карбонат калію (28 кг) до розчину 2-пропанаміну (12 кг) у етилацетаті (108 кг) при температурі <20°C. Охолоджують одержану суміш до температури від 5°C до приблизно 0°C, та додають ацетилхлорид (16,7 кг) у кількості приблизно 2-3 кг/год. Перемішують до завершення реакції за даними газової хроматографії. Гасять реакційну суміш водою (0,8 кг), фільтрують одержану реакційну суміш, концентрують, та одержують 13,4 кг вказаної в заголовку сполуки. ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

д. N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-ізопропілацетамідин

Додають фосфорилхлорид (16,0 кг) до суміші 4-бром-2,6-дифторфеніламіну (14,5 кг), N-ізопропілацетаміду (8,5 кг) та TEA (10,6 кг) у толуолі (115 кг) при температурі <20°C. Перемішують при 10-20°C до завершення реакції за даними HPLC. Видаляють розчинник у вакуумі, та додають MtBE (64 кг). Регулюють рН одержаної суміші 10 % водним розчином карбонату натрію (250 кг). Фільтрують одержану суміш, та промивають одержаний осад на фільтрі метил-трет-бутиловим ефіром (11×2 кг). Розділяють одержані фази, та промивають водний шар метил-трет-бутиловим ефіром (22×2 кг). Об'єднують одержані органічні шари, концентрують, фільтрують, промивають циклогексаном (0,6 кг), сушать, та одержують 17,2 кг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=292 (M+H)<sup>+</sup>.

е. 6-бром-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензимидазол

Додають порціями трет-бутилат калію (6,9 кг) до розчину N-(4-бром-2,6-дифторфеніл)-N'-ізопропілацетамідину (16,2 кг) у N-метилформаміді (76 кг), підтримуючи при цьому температуру <30°C. Нагрівають одержану суміш до 70-75°C, та витримують до завершення реакції за даними HPLC. Охолоджують до 20-30°C, гасять шляхом виливання у воду (227 кг), після чого екстрагують метил-трет-бутиловим ефіром (37×4 кг). Промивають одержані органічні фази розсолем (49×2 кг), концентрують до 25-30 л, додають n-гексан (64 кг), фільтрують одержану суспензію, та одержують 11 кг вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=272 (M+H)<sup>+</sup>.

Одержану речовину також очищають шляхом розчинення неочищеного залишку сполуки у DCM та фільтрування через шар силікагелю та целіту, з подальшим виділенням із суміші MtBE/гексан.

ф. 4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1H-бензимидазол

Барботують азот через суміш 6-бром-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензимидазолу (600 г),

біс(пінаcolato)дибору (843 г), трициклогексилфосфіну (106 г), ацетату калію (652 г) та DMSO (3,6 л). Додають ацетат паладію (49 г), нагрівають та витримують при 100°C до завершення реакції за даними HPLC. Охолоджують реакційну суміш, та розводять водою (18 л), після чого фільтрують для виділення утвореної твердої речовини. Розчиняють неочищену речовину у 1,2-

5 диметоксіетані (450 мл), та фільтрують через Celit®. Використовують одержаний фільтрат безпосередньо на стадії g.

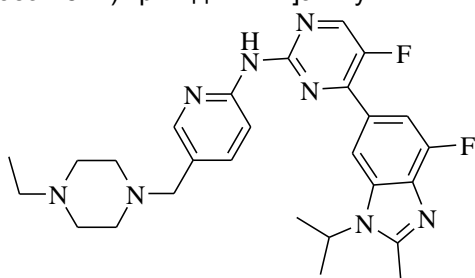
g. 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензimidазол

Барботують азот через суміш 2,4-дихлор-5-фторпіримідину (517 г), карбонату натрію (586 г) у воді (1,7 л) та 1,2-диметоксіетані (3,4 л). Додають хлорид біс(трифенілфосфін)паладію(II) (4,9 г), нагрівають одержану реакційну суміш до 80±3°C, та додають краплями розчин 4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-[1,3,2]діоксаборолан-2-іл)-1H-бензimidазолу у 1,2-

10 диметоксіетані, одержаний на стадії f (5,1 л). Перемишують реакційну суміш при 80±3°C до завершення реакції за даними HPLC. Охолоджують до кімнатної температури, та розводять холодною водою (2,1 л, 5°C). Перемишують протягом 1 год., після чого виділяють неочищену

15 тверду речовину фільтруванням. Потім очищують утворену тверду речовину шляхом розтирання з IPA, та одержують 472 г вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=323 (M+H)<sup>+</sup>.

h. Кристалічна форма III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3H-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну



20 Барботують азот через суміш 6-(2-хлор-5-фторпіримідин-4-іл)-4-фтор-1-ізопропіл-2-метил-1H-бензimidазолу (465 г), 5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іламіну (321 г), карбонату калію (403 г) та 4,5-біс(дифенілфосфіно)-9,9-диметилксантену (17 г) у трет-аміловому спирті (2,3 л). Нагрівають трис(добензиліденацетон)дипаладій (13,2 г), та витримують одержану суміш при 100±5°C до завершення реакції за даними HPLC. Охолоджують до кімнатної температури,

25 розводять дихлорметаном (1,2 л), та фільтрують через шар целіту. Екстрагують одержаний фільтрат 4M розчином HCl (2×2,3 л). Об'єднують водні шари, та перемишують з деревним вугіллям (32 г). Фільтрують через целіт, додають DCM (1,7 л), та регулюють pH, додаючи NaOH (28 % водний розчин, 1,5 л). Відділяють органічний шар, та промивають водний шар дихлорметаном (1,7 л). Об'єднують органічні шари, промивають розсолон (1 л), та сушать сульфатом магнію. Залишок паладію видаляють шляхом обробки кремнієм,

30 функціоналізованим тіолом, на твердому носії, та розчинник замінюють на ацетон. Фільтрують одержану суспензію, сушать, та одержують 605 г неочищеного продукту у вигляді Форми I. Змішують 605 г форми I та 4,3 л безводного ацетону. Перемишують утворену суспензію при 56-57°C (киплять зі зворотним холодильником) протягом щонайменше 18 год., а потім при

35 температурі навколишнього середовища протягом 4 год. Виділяють утворену тверду речовину шляхом вакуумного фільтрування, одержуючи світло-жовтий осад. Сушать утворену тверду речовину у вакуум-сушильній шафі при 35°C до одержання незмінної маси 570 г. За даними XRPD підтверджують, що одержана сполука є Формою III вказаної в заголовку сполуки. MS (ES<sup>+</sup>): m/z=507 (M+H)<sup>+</sup>.

40 Результати наведених нижче аналізів свідчать про те, що сполуки, наведені як приклад у цьому описі, є придатними як специфічні інгібітори CDK4/6 та як протиракові агенти. У значенні, вживаному у цьому описі, "IC<sub>50</sub>" означає концентрацію агенту, що викликає 50 % максимальної пригнічувальної реакції, можливої для цього агенту, а "EC<sub>50</sub>" означає концентрацію агенту, що викликає 50 % максимальної реакції, можливої для цього агенту.

45 Аналіз пригнічення CDK4

Для демонстрації того, що сполуки, включені до цього винаходу, демонструють спорідненість до CDK4, проводять аналіз CDK4. Результати функціональних аналізів свідчать про те, що сполуки за цим винаходом демонструють здатність до пригнічення активності CDK4. Усі ліганди, радіоактивні мітки, розчинники та реактиви, що застосовують у наведених нижче

50 аналізах, є легко доступними з комерційних джерел або можуть бути легко синтезованими фахівцем у цій галузі.

10 мкл експериментальної сполуки у розчині, що містить 20 % DMSO, 20 мкл аденозин-5'-трифосфату (ATP) та С-кінцевий фрагмент білка гену ретинобластоми (CTRF) (компанії Upstate, номер за каталогом 12-439), і 10 мкл розчину ферменту змішують у 96-лунковому планшеті. Розчин ATP і CTRF одержують з суміші 40 мкМ розчину ATP, 0,16 мкКюрі [<sup>33</sup>P] -ATP та 1 мкМ розчину CTRF, розведеного у кіназному буфері, який містить 68 мМ розчин 4-(2-гідроксietил)-1-піперазинетансульфонову кислоту (HEPES), рН 7,4, 6,72 мМ розчин MgCl<sub>2</sub>, 6,72 мМ розчин дитіотреїтолу (DTT) та 0,013 % розчин TRITON<sup>TM</sup>-100. Розчин ферменту одержують з 8 нг ферменту CDK4 (компанії Proqinase, номер за каталогом 0142-0373-1), розведених у кіназному буфері, опис якого наведено вище. Експериментальні сполуки послідовно розбавляють 1:3 у 20 % DMSO з одержанням десятиточкової кривої при вихідній концентрації 20 мкМ. 20 % буферний розчин DMSO без доданої експериментальної сполуки застосовують як контроль; 500 мМ розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) застосовують для визначення фонового рівня <sup>33</sup>P за відсутності активності ферменту. Реактиви змішують та інкубують впродовж 90 хв при температурі 20°C. Реакцію припиняють шляхом додання 80 мкл 10 % (у об'ємному відношенні) розчину H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> з осадженням матеріалу на скловолоконних фільтрувальних планшетах (компанії Millipore, MAFC N0B 50). Лунки промивають чотири рази 0,5 % розчином H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> і рівень включеної радіоактивності визначають за допомогою мікропланшетного сцинтиляційного лічильника (компанії Microbeta Trilux, Wallac).

Різницю між середнім значенням високої та низької концентрації контролю приймають за 100 % активність. Підгонку чотирипараметричної логістичної кривої здійснюють для одержання значень IC<sub>50</sub> за допомогою програми ActivityBase<sup>TM</sup> (компанії IDBS, Alameda, штат Каліфорнія). Усі мезилатні солі наведених як приклад сполук демонструють у вищезгаданому аналізі IC<sub>50</sub> < 10 нМ. Сполука за Прикладом 25 має у вищезгаданому аналізі IC<sub>50</sub> 3 нМ. Це показує, що мезилатні солі наведених як приклад сполук є активними інгібіторами CDK4.

#### Аналіз пригнічення CDK6

10 мкл експериментальної сполуки у розчині, що містить 20 % DMSO, 20 мкл ATP та CTRF (компанії Upstate, номер за каталогом 12-439), і 10 мкл розчину ферменту змішують у 96-лунковому планшеті. Розчин ATP і CTRF одержують з кінцевою концентрацією 100 мкМ розчину ATP, 0,5 мкКюрі [<sup>33</sup>P] -ATP та 0,8 мкМ розчину CTRF, розведений у кіназному буфері, який містить 68 мМ розчин HEPES, рН 7,4, 6,72 мМ розчин MgCl<sub>2</sub>, 2,64 мМ розчин DTT та 0,004 % розчин TRITON<sup>TM</sup>-100. Розчин ферменту одержують з кінцевою концентрацією 1,7 нг/мл ферменту CDK6 (компанії Proqinase, номер за каталогом 7533), розведеного у кіназному буфері, опис якого наведено вище у експерименті з пригнічення CDK4. Експериментальні сполуки серійно розбавляють 1:3 у 20 % DMSO з одержанням десятиточкової кривої при вихідній концентрації 20 мкМ. 20 % буферний розчин DMSO без доданої експериментальної сполуки застосовують як контроль; 500 мМ розчин EDTA застосовують для визначення фонового рівня <sup>33</sup>P за відсутності активності ферменту. Реактиви змішують та інкубують впродовж 90 хв при температурі 20°C. Реакцію припиняють шляхом додання 80 мкл 10 % (у об'ємному відношенні) розчину H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> з осадженням матеріалу на скловолоконних фільтрувальних планшетах (компанії Millipore, MAFC N0B 50). Лунки промивають чотири рази 0,5 % розчином H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> і рівень включеної радіоактивності визначають за допомогою мікропланшетного сцинтиляційного лічильника (компанії Microbeta Trilux, Wallac).

Дані аналізують таким же самим чином, що і для CDK4. Наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, демонструють у вищезгаданому аналізі IC<sub>50</sub> < 30 нМ. Сполука за Прикладом 19 має у вищезгаданому аналізі IC<sub>50</sub> 5 нМ. Це показує, що наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, є активними інгібіторами CDK6.

#### Аналіз пригнічення PIM1 кінази

Pim-1 (людська, 0,46 нМ кінцева концентрація) інкубують з 8 мМ розчином MOPS, рН 7,0, 0,2 мМ розчином EDTA, 100 мкМ розчином відповідного субстратного пептиду (дивись методику проведення аналізу пригнічення Pim-1 кінази, опис якої наведено у Chen, L.S. et al. (2009) Blood, DOI: 10.1182/blood-2009-03-212852), 10 мМ розчином ацетату Mg та [γ-<sup>33</sup>P-ATP] (специфічна активність приблизно 500 імпульсів/хв/пмоль, концентрація за потребою). Реакцію розпочинають шляхом додання суміші MgATP з подальшим інкубуванням впродовж 40 хв при кімнатній температурі. Реакцію припиняють шляхом додання 3 % розчину фосфорної кислоти. Після цього 10 мкл реакційної суміші наносять на фільтрувальний мат P30, тричі промивають впродовж 5 хв у 75 мМ розчині фосфорної кислоти і один раз у метанолі перед висушуванням та проведенням визначень за допомогою сцинтиляційного лічильника. Для випробування пригнічення сполук, сполуки, надані у вигляді 10 мМ концентрованих розчинів в 100 % DMSO, розбавляють 1:10 у 100 % DMSO з одержанням 50× концентрованого розчину максимальної концентрації кривої. Після цього 50× концентрований розчин послідовно розбавляють 1:3 у

100 % DMSO з одержанням десятиточкової кривої залежності "концентрація-реакція" і розбавляють 1:50 (від 20 мкМ до кінцевої концентрації 0,001 мкМ у DMSO з кінцевою концентрацією 2 %) у реакційній суміші для визначення активності сполуки. При визначенні вихідного рівня, контрольні лунки містять лише DMSO, і реакція припиняється кислотою у

5

часовій точці 0 хв. Відсоткове пригнічення, визначене за допомогою контрольних лунок на кожному планшеті, та дані десяти точок концентрації сполуки у подальшому підганялись за допомогою чотирипараметричного логістичного рівняння із застосуванням програми ACTIVITYBASE 4.0.

10

Наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, демонструють  $IC_{50} < 0,01$  мМ. Сполука за Прикладом 25 має у вищезгаданому аналізі  $IC_{50}$  0,003 мкМ. Це показує, що наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, є активними інгібіторами Pim-1 кінази.

Аналіз розчинності

Відповідні кількості експериментальної сполуки відважують до окремих хроматографічних пробірок. До пробірки із зразком додають необхідну кількість 0,05 М фосфатного буфера, рН 8,0 (розчинити 6,7 г двохосновного фосфату натрію  $\times 7H_2O$  у 500 мл води хроматографічної чистоти, довести до рН 8,0 85 % розчином фосфорної кислоти) для досягнення цільової концентрації 2,0 мг/мл. Відповідний стандартний розчин у DMSO одержують шляхом додання необхідного об'єму DMSO до стандартної пробірки для досягнення цільової концентрації 2,0 мг/мл. Пробірки надійно закривають і вміщують до ротаційного пристрою. Пробірки обертають на  $360^\circ$  впродовж щонайменше 16 год. при температурі навколишнього середовища з кутовою швидкістю приблизно 50 об/хв. Після завершення обертання здійснюють візуальну перевірку окремих пробірок. 250 мкл з кожної пробірки фільтрують за допомогою 0,7 мкм фільтру Шотта. Фільтрат зразка і фільтрат стандарту збирають до окремих лунок 96-лункового планшету з глибокими лунками. Шляхом відповідного серійного розведення стандартного розчину (2,0 мг/мл) у DMSO, одержують ряд розведень (2000 мкг/мл, 200 мкг/мл, 20 мкг/мл, 2,0 мкг/мл і контрольний зразок DMSO).

15

20

25

Розчини зразка і стандартні розчини аналізують засобами HPLC (Колонка для рідинного хроматографування: XTerra MS, C18,  $2,1 \times 50$  мм, 3,5 мкм, при температурі  $50^\circ C$ ; рухомі фази: А – 0,2 % розчин мурашиної кислоти у воді; В – 0,2 % розчин мурашиної кислоти у ацетонітрилі; градієнт: 5-100 % В впродовж 3 хв, витримання при 100 % В впродовж 0,5 хв; швидкість потоку: 750 мкл/хв; об'єм введення: 1 мкл; сканування детектором на діодній матриці у межах від 200 нм до 400 нм. Визначену довжину хвилі, що застосовується для кількісного визначення, вибирають таким чином, щоб забезпечити найбільш точну оцінку зразків). Час утримування для розподілу піків для експериментальної сполуки визначають за допомогою хроматограми стандартних препаратів (200 мкг/мл).

30

35

Коефіцієнти розчинності обчислюють за допомогою чотирирівневої калібраційної кривої. Застосовують лінію найкращої відповідності для пікової ділянки калібраційних стандартів, обчислену системою обробки хроматографічних даних із застосуванням лінійної або квадратичної підгонки з нульовою точкою. Результати визначення розчинності представлені у мг/мл. При проведенні вищезгаданого аналізу, сполука за Прикладом 16 демонструє розчинність у фосфатному буфері (рН 8) щонайменше 2 мг/мл. При проведенні вищезгаданого аналізу, сполука за Прикладом 16 демонструє розчинність у фосфатному буфері (рН 8) на рівні 2,099 мг/мл. Таким чином, ці дані демонструють, що наведені як приклад сполуки за цим винаходом, яким віддається перевага, є легкорозчинними у водному розчині.

40

45

Аналіз пероральної біодоступності на пацюках

Пацюків-самців лінії Sprague Dawley (маса тіла у межах 250-320 г) з постійно катетеризованою стегною артерією одержали від компанії Charles River, Wilmington, штат Массачусетс 01887, США. Експериментальну сполуку вводять внутрішньовенним шляхом у розчині (2 мл/кг) у: 10 % розчині N-метилпіролідону/18 % розчині Captisol<sup>®</sup> у 22,5 мМ розчині фосфатного буфера, рН 3. Кінцева концентрація лікарського засобу становить 0,25 мг/мл (еквіваленти вільної основи). Проби крові відбирають через постійний катетер впродовж 24 год. Після цього тваринам вводять пероральну дозу експериментальної сполуки у суспензії (5 мл/кг) у 1 % (у відношенні маси до об'єму) розчині гідроксіетилцелюлози/0,25 % (у об'ємному відношенні) розчині полісорбату 80/0,05 % (у об'ємному відношенні) розчині протиспінювача у дистильованій воді. Кінцева концентрація лікарського засобу становить 0,2 мг/мл (еквіваленти вільної основи). Додаткові проби крові відбирають через постійний катетер впродовж 24 год. Зразки плазми одержують шляхом центрифугування і зберігають замороженими ( $-20^\circ C$ ) до проведення аналізів.

50

55

Сполуку, яка відіграє роль внутрішнього стандарту (для нормалізації) у суміші ацетонітрилу/метанолу (1:1, у об'ємному відношенні), додають до зразків плазми для осадження білка, і зразки центрифугують перед проведенням аналізу. Супернатанти аналізують шляхом введення і швидкого градієнтного елюювання на колонці Javelin Betasil C18 (картридж 20×2,1 мм, рухома фаза А: вода/1 М розчин бікарбонату амонію, 2000:10 у об'ємному відношенні, рухома фаза В: MeOH/1 М розчин бікарбонату амонію, 2000:10 у об'ємному відношенні). Елюювані досліджувані речовини виявляють шляхом LC-MS-MS (рідинна хроматографія/мас-спектрометрія/мас-спектроскопія) аналізу за допомогою потрійного квадрупольного мас-спектрометра Sciex API 4000. Концентрації сполук у плазмі визначають за стандартами, які одержали за ідентичних умов.

Пероральну біодоступність визначають шляхом поділу площини під кривою залежності між концентрацією у плазмі та часом після перорального введення та площу під кривою після внутрішньовенного введення (після нормалізації на введену дозу). Результати представлені як біодоступна частка відносно внутрішньовенної дози (%F). Наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, демонструють у вищезгаданому аналізі значення %F>20 %. Сполука за Прикладом 22 демонструє у вищезгаданому аналізі значення %F, що дорівнює 48,5 %. Це показує, що наведені як приклад сполуки, яким віддається перевага, мають добру пероральну біодоступність.

Аналіз пригнічення фосфорилювання ретинобластомного білка (pRb) та вмісту ДНК

Клітини лінії COLO 205 від Американської колекції типових культур (ATCC) висівають на 96-лункові планшети Dickinson BIOCOAT™ компанії Beckman з розрахунку 2000 клітин/лунку та інкубують у середовищі RPMI 1640 (наприклад, номер за каталогом компанії GIBCO 52400-025) з 10 % сироватки плода корови (FBS, наприклад, номер за каталогом компанії GIBCO 11000-144) та 1 % пірувату натрію (номер за каталогом компанії GIBCO 11360-070) при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> впродовж 24 год. Клітини обробляють шляхом додання експериментальної сполуки до середовища, з введенням дози у 10 точках розведень 1:3 у діапазоні від 20 мкМ до 0,001 мкМ і з кінцевою 0,25 % концентрацією DMSO. Після 24 год. знаходження під впливом згаданих сполук, клітини фіксують засобом для фіксації PREFER™ [компанії Anatech LTD., номер за каталогом 414] впродовж 30 хв при кімнатній температурі, після чого коефіцієнт їхньої проникності підвищують за допомогою 0,1 % розчину TRITON® X100 у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS) впродовж 15 хв при кімнатній температурі. Клітини двічі промивають PBS, після чого гідролізують розчином (50 мкг/мл) РНКаз (Ribonuclease A, номер за каталогом компанії Sigma R-6513) у термостаті при температурі 37°C впродовж 60 хв. Фіксовані клітини блокують 1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA, номер за каталогом компанії Amersham RPN412V) впродовж 30 хв. Головне антитіло, очищене мишаче анти-фосфо-Rb моноклональне антитіло (номер за каталогом компанії BD Pharmingen 558385), додають до клітин у розведенні 1:2000 у PBS з 1 % BSA, та інкубують впродовж ночі при температурі 4°C. Після 3 промивань PBS, клітини інкубують міченим допоміжним антитілом Alexa488, козячим антимишачим IgG Alexa 488 (номер за каталогом компанії Invitrogen A11017), впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Клітини знову тричі промивають PBS, після чого додають 15 мкМ розчин йодиду пропідію (розведення 1:100 у PBS з вихідного розчину, номер за каталогом компанії Invitrogen P3566) для забарвлення ядер. Флуоресцентні планшети сканують за допомогою ACUMEN EXPLORER™ [флуоресцентний мікропланшетний цитометр з лазерним скануванням (джерело збудження – іонізований 488 нм аргонний лазер, детектування – численні електронно-променеві трубки), що виробляється компанією TTP LABTECH LTD] для визначення фосфорилювання білка Rb та вмісту ДНК. Аналіз зображень засновується на флуоресцентних сигналах клітин для ідентифікації клітин у різних субпопуляціях. Результати аналізу представлені як відсоток кожної з ідентифікованих субпопуляцій, % фосфо-RB позитивних, % 2N та % 4N. Значення IC<sub>50</sub> та EC<sub>50</sub> визначають шляхом підгонки кривих за чотирипараметричним логістичним рівнянням для кожного аналізу за допомогою програми ACTIVITY BASE™. Усі мезилатні солі сполук, наведених як приклад, у вищенаведеному аналізі демонструють IC<sub>50</sub><200 нМ. Сполука за Прикладом 25 у вищенаведеному аналізі має активність приблизно 100 нМ. Це показує, що мезилатні солі сполук, наведених як приклад, є активними інгібіторами активності CDK4/6 (як визначається низьким рівнем фосфорилювання pRb) у in vitro цільноклітинному аналізі.

На додаток до цього, усі мезилатні солі сполук, наведених як приклад, можуть індукувати специфічну затримку G1-фази клітинного циклу навіть у разі присутності у концентраціях щонайменше 2 мкМ. На специфічну затримку G1-фази вказує >90 % клітин, що мають генотип 2N. Специфічна затримка G1-фази навіть при фізіологічно відповідних концентраціях активної сполуки показує, що сполуки за цим винаходом є специфічними інгібіторами CDK4/6 і що

неспецифічне пригнічення інших Cdks, наслідком якого може бути затримка клітинного циклу на інших фазах, зводиться до мінімального рівня.

#### Моделі людських підшкірних ксенотрансплантатів

Клітини людського раку ободової та прямої кишки (colo-205), клітини (MV4-11) людського гострого мієлоїдного лейкозу (AML), клітини (U87MG) людської гліобластоми та клітини (NCI H460 та салу 6) людського раку легень розмножують у культурі (colo-205 та NCI H460 вирощують у середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном, 25 мМ HEPES, 1 мМ пірувату натрію, 10 % FBS; MV4-11 вирощують у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Есков з L-глутаміном, 25 мМ HEPES, 10 % FBS; U87MG та салу 6 вирощують у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Егла з солями Ерла, L-глутаміном та замінними амінокислотами, 1 мМ пірувату натрію та 10 % FBS, збирають (colo-205, U87-MG, салу 6 та NCI-H460 піддають трипсинізації (номер за каталогом компанії Invitrogen 25200-056); MV4-11 шляхом центрифугування) і вводять підшкірним шляхом (5 млн клітин/тварину, змішаних 1:1 з матригелем, компанії BD Biosciences) до задньої частини боку "голої" миші. Експериментальну сполуку одержують у відповідному носії (1 % гідроксіетилцелюлози у 25 мМ розчині фосфатного буфера, pH 2), і за допомогою шлунокового зонда вводять кожного дня (25 мг/кг, 50 мг/кг або 100 мг/кг) впродовж 21 дня до появи пухлин (через 11-29 днів після імплантації). Пухлинна реакція визначається шляхом визначення об'єму пухлин, яке проводять двічі на тиждень впродовж періоду обробки.

Статистичний спосіб оцінювання TGD – уповільнення росту пухлини (індивідуальний метод інтерполяції TGD) виглядає таким чином: для кожної тварини час досягнення пухлиною визначеного об'єму (поріг) обчислюють шляхом інтерполяції у межах від останнього визначення перед досягненням порогу та наступним визначенням. Ентерполяція є лінійною із застосуванням залежності між  $\log_{10}(\text{об'єму})$  та часом. Якщо тварина ніколи не досягає порогового рівня, час переходу для неї позначають як ">T", де T – останній день проведення визначень для цієї тварини. Ці часи переходу аналізують як дані "час до явища" з правим цензуруванням із застосуванням розподілу Вейбулла. Для кожної експериментальної групи визначають середнє та середнє квадратичне відхилення. Уповільненням росту пухлини (TGD) є різниця середнього часу переходу між експериментальною групою та контрольною групою, яка одержувала носій. Оцінку за t-критерієм Стюдента здійснюють із застосуванням середніх та середніх квадратичних відхилень за аналізом Вейбулла. Маса тіла приймається як загальний критерій токсичності.

За методикою, яка по суті відповідає наведеній вище, сполука за Прикладом 16 демонструє протипухлинну активність на цих моделях, як показано у Таблиці 3, що свідчить про те, що сполука за Прикладом 16 має сильну *in vivo* активність проти ряду  $\text{Rb}^+$  пухлин.

Крім того, у разі ксенотрансплантатів AML MV4-11, при дозі 100 мг/кг (mpk) спостерігався зворотний розвиток пухлин, що вказує на проапоптозну Pim-1 пригнічувальну активність сполуки за Прикладом 16; дивись Таблицю 4.

Таблиця 3

Уповільнення росту пухлини на різних моделях людського ксенотрансплантата

| Ксенотрансплантат | Доза      | TGD, дні (750 мм <sup>3</sup> ) | Середня квадратична помилка |
|-------------------|-----------|---------------------------------|-----------------------------|
| colo-205          | 100 мг/кг | 39,9                            | 4,6                         |
|                   | 50 мг/кг  | 17,4                            | 3,2                         |
|                   | 25 мг/кг  | 15,3                            | 3,8                         |
| MV4-11            | 100 мг/кг | 28,8                            | 1,1                         |
|                   | 50 мг/кг  | 11,5                            | 4,0                         |
|                   | 25 мг/кг  | 10,4                            | 4,7                         |
| U87 MG            | 100 мг/кг | 21,4                            | 2,7                         |
|                   | 50 мг/кг  | 10,0                            | 2,2                         |
|                   | 25 мг/кг  | 6,1                             | 3,2                         |
| H460              | 100 мг/кг | 6,7                             | 2,7                         |
|                   | 50 мг/кг  | 4,0                             | 4,2                         |
|                   | 25 мг/кг  | 1,5                             | 1,8                         |



Таблиця 4

Протипухлинна активність сполуки за Прикладом 16 на моделі MV4-11

| Обробка  | Об'єм пухлин (мг) перед початком введення доз (28 день) | Середня квадратична помилка (SE) (мг) | Величина р | Об'єм пухлин на момент закінчення введення доз (49 день) | SE (мг) | Величина р |
|--|---|---------------------------------------|------------|--|---------|------------|
| Носій, 0,2 мл, per os, доза qdx21/1 % НЕС+0,1 % AF у 25 мМ розчині РВ рН 2 | 219,45  | 17,42                                 | Ctrl       | 1271,15  | 100,9   | Ctrl       |
| Сполука за прикладом 16, 100 мг/кг, per os, доза qdx21                     | 225,94  | 29,61                                 | NS         | 116,68   | 15,29   | ***        |

Визначення об'єму пухлин. Величина Р є статистично значущою, порівняно з контрольною групою, що одержувала носій (Ctrl), на день визначення. NS, не значуща; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

5 Модель ортотопічного ксенотрансплантата головного мозку

In vivo модель пухлини головного мозку: Пацієнтів-самців лінії NIH-RNU масою 225-300 г наркотизують ізофлураном і розміщують у стереотаксичній рамці (компанії David Kopf Instruments, Tujunga, штат Каліфорнія). Роблять розтин по середній лінії, і на відстані 2 мм вбік від середньої лінії та 3 мм перед вінцевим швом висвердлюють 1 мм трепанаційний отвір. 10 мкл ( $5 \times 10^5$  клітин для qd і  $1 \times 10^6$  клітин для q2d) суспензії клітин ( $5 \times 10^5$  клітин людської гліобластоми U87 MG (які були вирощені у модифікованому за способом Дюльбекко середовищі Егла з солями Ерла, L-глутаміном та замінними амінокислотами, 1 мМ розчином пірувату натрію та 10 % FBS)) вводять на глибину 3 мм за допомогою 25 мкл або 50 мкл шприца Гамільтона впродовж приблизно 2 хв із застосуванням змонтованого на стереотаксичній рамці шприцевого насоса (Nano-Injector (модель а 53310) та стереотаксичний адаптерний затискач (деталь а 51681) компанії Stoelting Co, Wood Dale, штат Еллінойс). Шприц залишається на місці впродовж 1 додаткової хвилини для запобігання зворотного току рідини з подальшим повільним його видаленням. Отвір герметизують кістковим жиром, операційне поле промивають фізіологічним розчином, а розріз закривають швами або затисками.

20 Досліджувану сполуку одержують у носії (розчин у дистильованій воді 1 % (у відношенні маси до об'єму) гідроксіетилцелюлози, 0,25 % (у об'ємному відношенні) полісорбату 80 та 0,05 % (у об'ємному відношенні) протиспінювача), і вводять кожного дня впродовж 21 дня у дозі 20 мг/кг (qdx21), 40 мг/кг (qdx21) та 80 мг/кг (qdx21) і 80 мг/кг (q2dx10), розпочинаючи з 4 дня після імплантації пухлини.

25 Головною змінною для визначення наслідків є виживаність. Тварин контролюють щоденно до настання смерті і, якщо тварина починає агонізувати, її, після проведення консультації з ветеринаром, умертвляють відповідно до методики імплантації пухлин. Клітини імплантують до лобної частки головного мозку для зведення до мінімального рівня потенційного порушення його функцій, наприклад, недостатності рухової активності та контролювання життєвих функцій організму. Пухлини лобної частки головного мозку у людей, як кажуть, є "мовчазними", тобто найпоширенішими наявними симптомами є головний біль, нудота, блювання та порушення пізнавальної здатності. Захворювання, таким чином, найімовірніше проявить себе сонливістю та втратою маси тіла. Показники виживаності аналізують за методом Каплана-Мейєра з аналізом медіани виживаності із застосуванням програми JMP v6.0.2 (компанії SAS Institute).

35 За методикою, опис якої по суті наведено вище, наслідком застосування сполуки за Прикладом 16 виявилось статистично значуще підвищення медіани виживаності (у разі порівняння з тваринами, які одержували носій) у наведених нижче дозах: 40 мг/кг qd, 80 мг/кг qd та 80 мг/кг q2d, (дивись таблицю 5), з демонстрацією, тим самим, що сполука за Прикладом 16 може долати гематоенцефалічний бар'єр і демонструє сильну in vivo пригнічувальну активність на моделі ортотопічного трансплантата гліобластоми.

Таблиця 5

Середня виживаність/медіана виживаності (дні), що є наслідком введення сполуки за Прикладом 16.

| Експериментальна група | Середня виживаність (дні) | Середня квадратична помилка (дні) | Величина р Логарифмічний ранговий критерій | Медіана виживаності (дні) |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|
| Носій, per os (PO), qd | 25,1                      | 2,8                               | -  | 27                        |
| PO 20 мг/кг qd         | 29,8                      | 0,7                               | 0,5  | 31                        |
| PO 40 мг/кг qd         | 34,3                      | 1,7                               | 0,0316                                     | 37                        |
| PO 80 мг/кг qd         | 36,9                      | 1,3                               | 0,0006                                     | 37                        |
| Носій, PO q2d          | 23,0                      | 3,5                               | -  | 24                        |
| PO 80 мг/кг q2d        | 33,0                      | 1,2                               | 0,0295                                     | 34                        |

У окремому експерименті, для визначення рівнів експозиції сполуки у плазмі та головному мозку, пацюкам-самцям лінії Sprague Dawley без пухлин вводять одну пероральну дозу (30 мг/кг) сполуки за Прикладом 16. Проби відбирають впродовж 48 год. для визначення концентрацій у плазмі та головному мозку. Тварин забивають, цільну кров збирають шляхом прокалювання серця, і плазму виділяють шляхом центрифугування. Цілий головний мозок видаляють і миттєво заморожують у рідкому азоті.

Зразки тканини головного мозку одержують шляхом гомогенізації у суміші 80 % метанолу/20 % H<sub>2</sub>O. Застосовувану як внутрішній стандарт сполуку у суміші ацетонітрилу/метанолу (1:1, у об'ємному відношенні) додають до зразків плазми або гомогенату головного мозку для осадження білка, і зразки центрифугують перед проведенням аналізу. Супернатанти аналізують шляхом введення і швидкого градієнтного елюювання на колонці Javelin Betasil C18 (картридж 20×2,1 мм, рухома фаза А: вода/1 М розчин NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 2000:10 у об'ємному відношенні, рухома фаза В: MeOH/1 М розчин NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 2000:10 у об'ємному відношенні). Елюювані досліджувані речовини виявляють шляхом LC-MS-MS (рідинна хроматографія/мас-спектрометрія/мас-спектроскопія) аналізу за допомогою потрійного квадрупольного мас-спектрометра Sciex API 4000. Концентрації сполук у плазмі або головному мозку визначають за стандартами, які одержали за ідентичних умов.

Концентрації у плазмі та головному мозку у цьому дослідженні визначають у групі з трьох пацюків у кожній часовій точці (Дивись Таблицю 6а та Таблицю 6б) і застосовують для обчислення площі під кривою "концентрація у плазмі/час" або кривою "концентрація у головному мозку/час" від 0 год. до 48 год. Аналіз коефіцієнту експозиції у головному мозку із застосуванням площі під кривою (AUC) або максимальної концентрації у плазмі та головному мозку (C<sub>max</sub>), дивись Таблицю 6с, демонструє, що згадана сполука добре розподіляється у головному мозку з коефіцієнтом головний мозок/плазма, що дорівнює приблизно 1. Максимальні концентрації (T<sub>max</sub>) виявляють у 4 год. точці. Ці експерименти демонструють, що сполука за Прикладом 16 може долати гематоенцефалічний бар'єр і добре розподіляється у головному мозку. У протилежність до цього, заявником встановлено, що сполука, якій віддається перевага у WO 03/062236 (6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-піперазин-1-іл-піридин-2-іламіно)-8Н-піrido[2,3-*d*]піримідин-7-он), демонструє коефіцієнти розподілу у головному мозку:плазмі 0,17 (AUC) та 0,1 (C<sub>max</sub>) у тому ж самому аналізі, що вказує на те, що згадана сполука на цій моделі у тканині головного мозку розподіляється відносно слабо.

Таблиця 6а

Концентрації сполуки за Прикладом 16 (нг/мл) у плазмі, визначені на пацюках-самцях лінії SD (Sprague Dawley)

| Час (год)                             | 2     | 4     | 24    | 48    |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Середнє                               | 1014  | 1504  | 1018  | 972,0 |
| Середнє квадратичне відхилення (S.D.) | 288,0 | 134,8 | 236,2 | 666,0 |
| %CV (коефіцієнт варіації)             | 28,4  | 9,0   | 23,2  | 68,5  |
| N                                     | 3     | 3     | 3     | 3     |

Таблиця 6b

Концентрації сполуки за Прикладом 16 (нг/г) у головному мозку, визначені на пацюках-самцях лінії SD

| Час (год) | 2     | 4     | 24    | 48    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| Середнє   | 758,5 | 1500  | 992,4 | 718,0 |
| S.D.      | 82,38 | 268,9 | 54,83 | 232,0 |
| %CV       | 10,86 | 17,93 | 5,525 | 32,31 |
| N         | 3     | 3     | 3     | 3     |

Таблиця 6с

Середня експозиція сполуки за прикладом 16 у плазмі та головному мозку, визначена на пацюках-самцях лінії SD

| Параметр         | Одиниці                | Плазма     | Головний мозок | Коефіцієнт головний мозок/плазма |
|------------------|------------------------|------------|----------------|----------------------------------|
| AUC              | нг×год/мл або нг×год/г | 52300      | 47900          | 0,92                             |
| Ентервал AUC     |                        | (0-48 год) | (0-48 год)     |                                  |
| C <sub>max</sub> | нг/мл або нг/г         | 1500       | 1500           | 1,0                              |
| T <sub>max</sub> | години                 | 4,00       | 4,00           |                                  |

Дослідження комбінації з темозоломідом

- Підшкірні трансплантати U87 MG вирощують і визначають, як описано вище. Сполуку за Прикладом 16 одержують і вводять, як описано вище, пероральним шляхом один раз на добу з 11 дня по 31 день. Темозоломід (компанії Schering Corporation) одержують у суміші 1 % (у відношенні маси до об'єму) розчину гідроксіетилцелюлози/0,25 % (у об'ємному відношенні) розчину полісорбату 80 у дистильованій воді і вводять шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції на 11 день та 18 день. Порівняння активності самостійно застосовуваного темозоломідом з комбінованою обробкою із сполукою за Прикладом 16 наведено у Таблиці 7. Ріст пухлин аналізують за допомогою двофакторного інтерактивного аналізу; log-трансформовані об'єми пухлин аналізували за допомогою дисперсійного аналізу з повторними вимірами (ANOVA) із застосуванням моделі просторової кореляції енергії за програмою SAS, версія 9.1 (компанії Cary, штат Північна Кароліна). Факторний експеримент 2×2 застосовували для оцінки ефектів обробки та ефекту взаємодії між двома варіантами обробки. Ефект взаємодії перевіряли в усіх часових точках ("комплексне" випробування) та в кожній часовій точці. Підвищене пригнічення росту пухлин, що спостерігалось у комбінованих групах, порівняно з групами, які одержували лише темозоломід, вказує на те, що темозоломід та сполука за Прикладом 16 у комбінації демонструють сильну *in vivo* протипухлинну активність на моделі підшкірного ксенотрансплантата гліобластоми.

Таблиця 7

Дослідження комбінації сполуки за Прикладом 16 та темозоломідом на ксенотрансплантаті U87-MG

| Обробка  | Об'єм пухлин (мг) на кінець періоду введення доз (31 день) | SE (мг) | Величина p |
|--|--|---------|------------|
| Носій, 0,2 мл, PO, qdx21/1 % HEC+0,1 % AF у 25 mM розчині PB, pH 2             | 456,54   | 169,3   | Ctrl       |
| Темозоломід, 3 мг/кг, IP, q7dx2  | 101,88   | 44,16   | **         |
| Сполука за Прикладом 16, 50 мг/кг, PO, qdx21 / темозоломід, 3 мг/кг, IP, q7dx2 | 30,22  | 7,57    | ***        |

Визначення об'єму пухлин. Величина Р є статистично значущою у порівнянні з контрольною групою (Ctrl), що одержувала носій, на день проведення визначень; \*\*: 0,001<math>p\leq 0,01</math>; \*\*\*:  $p\leq 0,001$ .

Ортотопічні ксенотрансплантати головного мозку U87 MG вирощують з визначенням виживаності, як описувалось вище. Групи тварин обробляють темозоломідом (TMZ) або комбінацією сполуки за Прикладом 16 (з введенням дози кожного дня або через день) плюс темозоломід. Як показано у Таблиці 8, підвищення середньої виживаності у комбінованих групах порівняно з групами, які одержували лише темозоломід, показує, що темозоломід і сполука за прикладом 16 у комбінації мають сильну *in vivo* пригнічувальну активність на моделі ортотопічних ксенотрансплантатів гліобластоми. Відсутність смертності та втрати маси тіла (дивись Таблицю 9) у разі комбінованих обробок вказує, що вони добре переносяться і не проявляють перехресної токсичності.

Таблиця 8

Середня виживаність/медіана виживаності (дні), що є наслідком введення сполуки за Прикладом 16 у комбінації з темозоломідом

| Експериментальна група   | Середня виживаність (дні) | Стандартна квадратична помилка (дні) | Величина р Логарифмічний ранговий критерій | Медіана виживаності (дні) |
|--|---------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|
| Носій, PO, 1 мл/кг qdx20   | 28,1                      | 1,9                                  | -  | 30                        |
| Темозоломід (TMZ) IP 3 мг/кг (дні 6 та 13)                           | 46,9                      | 3,3                                  | <0,0001                                    | 47                        |
| Сполука за Прикладом 16, 40 мг/кг qdx20+TMZ IP 3 мг/кг (Дні 6 та 13) | 60,1                      | 3,6                                  | 0,0002                                     | 61                        |
| Сполука за Прикладом 16 40 мг/кг q2dx10+TMZ IP 3 мг/кг (Дні 6 та 13) | 70,5                      | 4,4                                  | 0,0032                                     | 70                        |

Таблиця 9

Смертність та маса тіла тварин з дослідження темозоломід/сполука за Прикладом 16

| Обробка  | Максимальна втрата маси тіла (%) | Кількість загиблих/загальна кількість тварин |
|--|----------------------------------|--|
| Носій, 0,2 мл, PO, qdx21/1 % HEC+0,1 % AF у 25 мМ розчині PB, pH 2           | 0                                | 0/8  |
| Темозоломід, 3 мг/кг, IP, q7dx2  | -1                               | 0/8  |
| Сполука за Прикладом 16, 50 мг/кг, PO, qdx21/темозоломід, 3 мг/кг, IP, q7dx2 | -1                               | 0/8  |

Дослідження комбінації з гемцитабіном

Підшкірні трансплантати Calu-6 (легені) вирощують і визначають, як описано вище. Гемцитабін одержували у фізіологічному розчині (0,9 % розчин хлориду натрію у дистильованій воді) і вводили шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції за схемою q3dx7. Експериментальну сполуку вводили за схемою qdx21. Порівняння активності самостійно застосовуваного гемцитабіну з комбінованими обробками гемцитабіном та сполукою за Прикладом 16 наведено у Таблиці 10. Ріст пухлин аналізують за допомогою двофакторного інтерактивного аналізу. Підвищене пригнічення росту пухлин, що спостерігалось у комбінованих групах, порівняно з групами, які одержували лише гемцитабін, вказує на те, що згадані лікарські засоби демонструють у комбінації сильну *in vivo* протипухлинну активність на моделі підшкірного ксенотрансплантата раку легень. Низький рівень смертності та втрати маси тіла у разі комбінованих обробок вказує, що вони добре переносяться, і дозволяє припустити відсутність перехресної токсичності (дивись Таблицю 11).

Таблиця 10

Дослідження комбінації сполуки за Прикладом 16 та гемцитабіну на ксенотрансплантаті Calu-6

| Обробка   | Об'єм пухлин (мг) на кінець періоду введення доз (38 день) | SE (мг) | Величина p |
|---|--|---------|------------|
| Носій, 1 % НЕС у 25 мМ розчині РВ рН 2, 0,2 мл, РО, qdx21 / фізіологічний розчин, 0,2 мл, ІР, q3dx7 | 949,73   | 202,66  | Ctrl       |
| Гемцитабін, 60 мг/кг, ІР, q3dx7   | 509,18   | 64,89   | **         |
| Сполука за Прикладом 16, 50 мг/кг, РО, qdx21 / Гемцитабін, 60 мг/кг, ІР, q3dx7                      | 234,94   | 30,86   | ***        |

Визначення об'єму пухлин. Величина Р є статистично значущою у порівнянні з контрольною групою (Ctrl), що одержувала носій, на день проведення визначень; \*\*: 0,001<р≤0,01; \*\*\*: р≤0,001.

5

Таблиця 11

Смертність та маса тіла тварин з дослідження гемцитабін/сполука за Прикладом 16

| Обробка   | Максимальна втрата маси тіла (%) | Кількість загиблих/загальна кількість тварин |
|---|----------------------------------|--|
| Носій, 1 % НЕС у 25 мМ розчині РВ рН 2, 0,2 мл, РО, qdx21 / фізіологічний розчин, 0,2 мл, ІР, q3dx7 | 0                                | 0/7  |
| Сполука за Прикладом 16, 50 мг/кг, РО, qdx21 / Гемцитабін, 60 мг/кг, ІР, q3dx7                      | -14                              | 1/7  |
| Гемцитабін, 60 мг/кг, ІР, q3dx7   | -12                              | 0/7  |

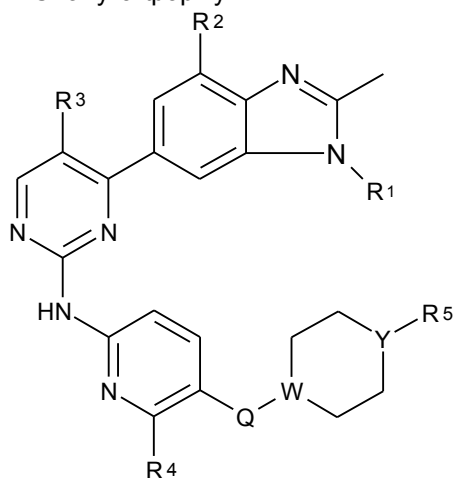
Перевагу віддають пероральному введенню сполук за цим винаходом. Перевагу віддають також внутрішньовенному введенню сполук за цим винаходом. У залежності від обставин, можуть застосовуватись інші шляхи введення або їм навіть може віддаватись перевага. Наприклад, підшкірне введення може бути дуже бажаним для хворих, що страждають на забудькуватість або яких дратує пероральне приймання лікарського засобу. Сполуки за цим винаходом можуть також вводитись черезшкірним, внутрішньом'язовим, інтраназальним або інтаректальним шляхом за особливих обставин. Шлях введення може змінюватись у будь-який спосіб, обмежуватись фізичними властивостями лікарських засобів, зручністю для хворого і медичного працівника та іншими відповідними обставинами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (1990)).

10

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули:



5

де

R1 - C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-алкіл, C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-циклоалкіл або циклопропілметил;  
R2 та R3 - H або фтор, де щонайменше один із R2 або R3 - фтор;  
R4 - H або CH<sub>3</sub>;

10 R5 - C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл або -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, де R6 та R7 - C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл;

Q - CH<sub>2</sub>, O, S або безпосередній зв'язок; та

W та Y - C або N, де щонайменше один із W або Y - N, та де якщо Q - O або S, то W - C;  
або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки.

15 2. Сполука за п. 1 або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де R1 - ізопропіл, циклопропіл, циклопентил або циклопропілметил.

3. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де кожен з R2 та R3 є фтором.

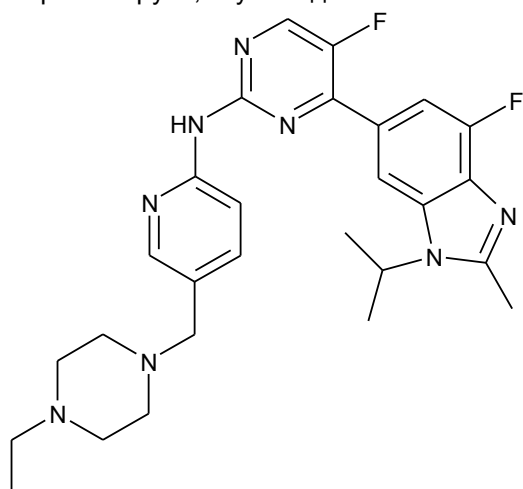
4. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де R4 - H.

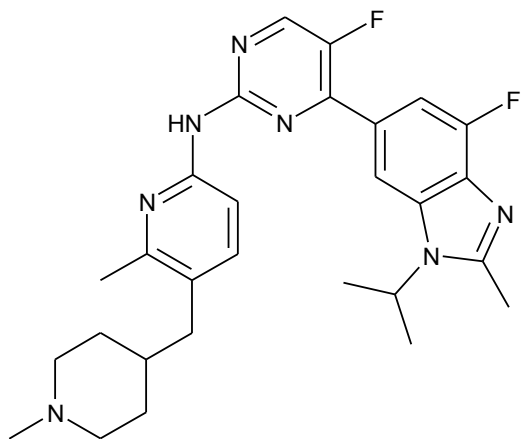
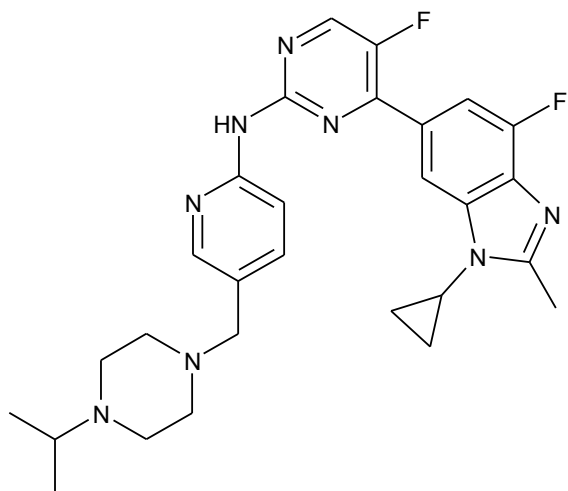
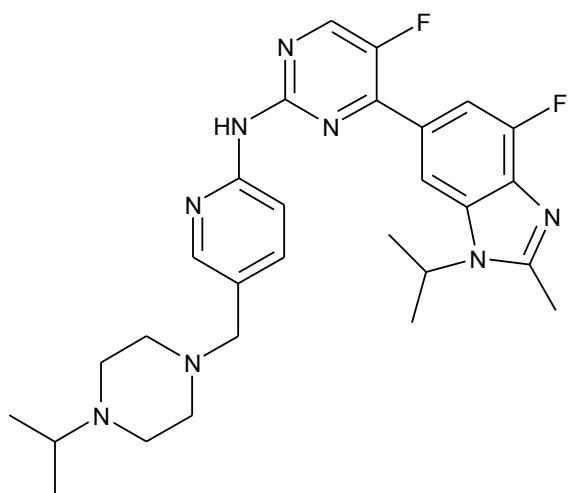
20 5. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де R5 - C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкіл.

6. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де Q - CH<sub>2</sub>.

25 7. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, де W - N.

8. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки, вибрана з групи, яку складають:

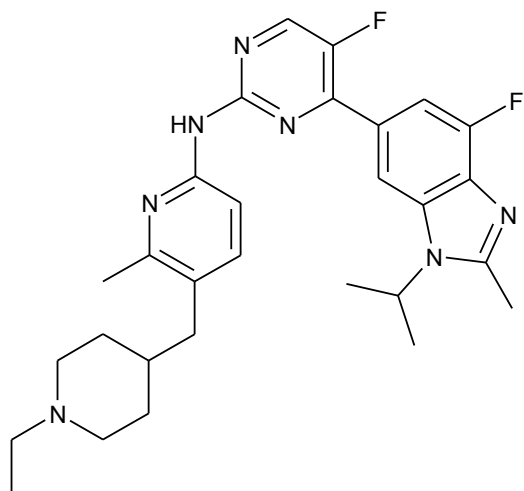




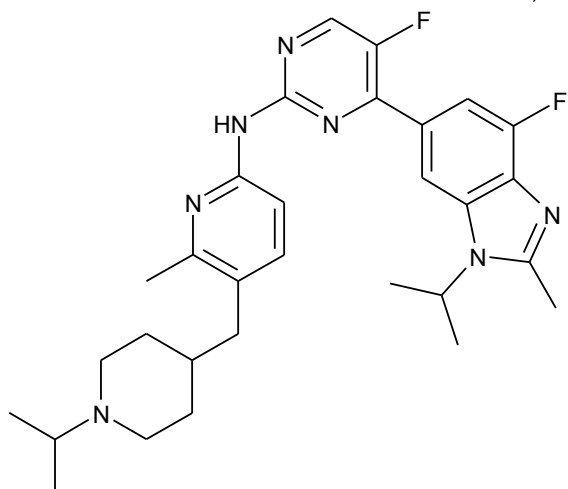
,

,

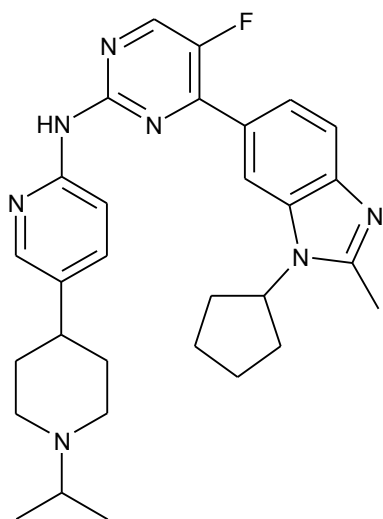
,



,

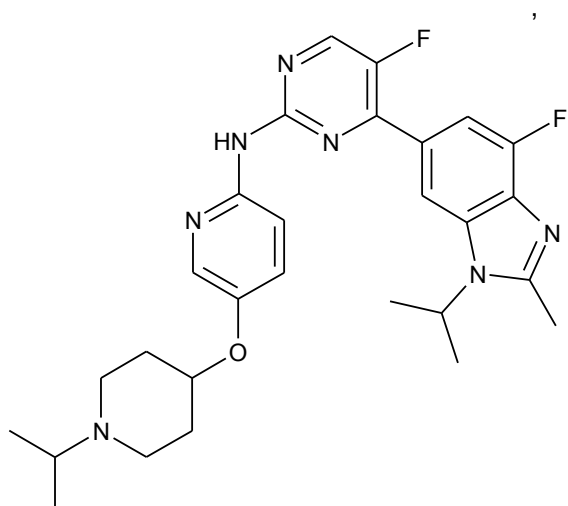
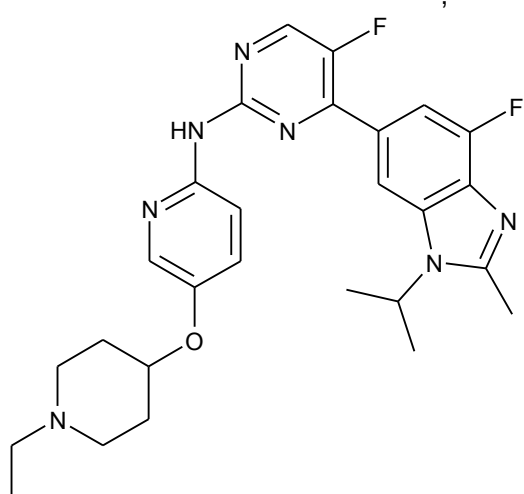
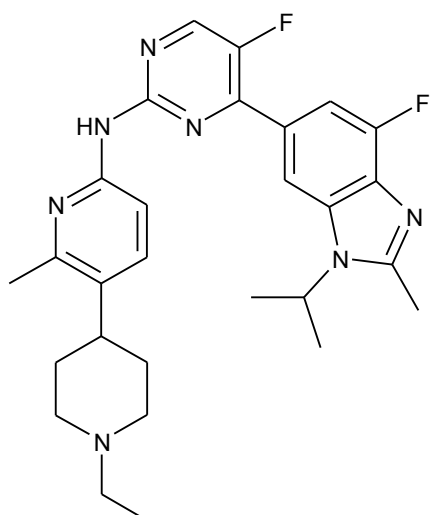


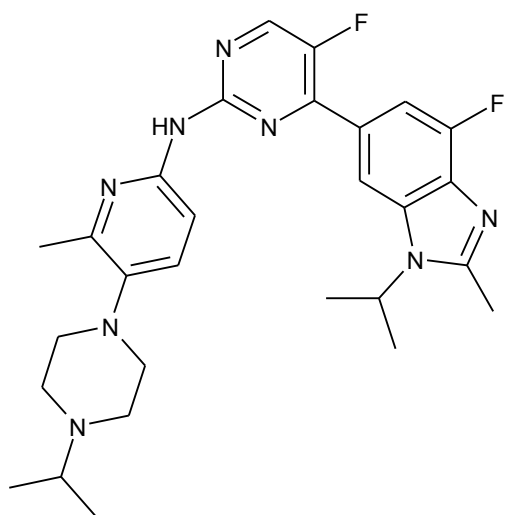
,



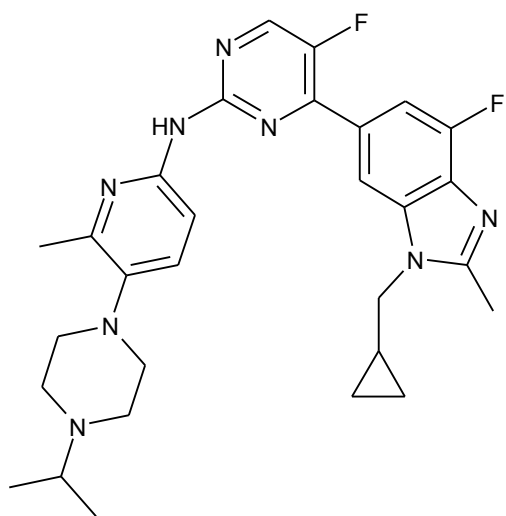
,



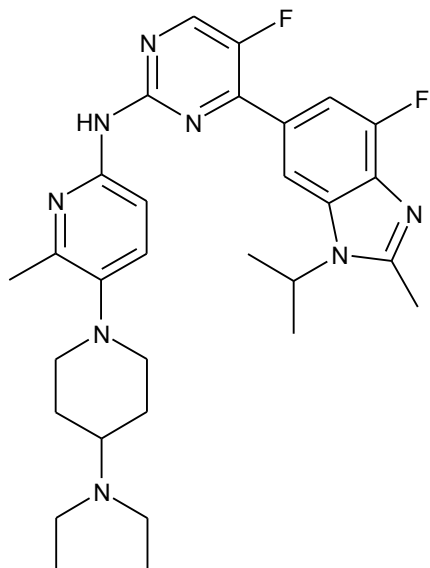




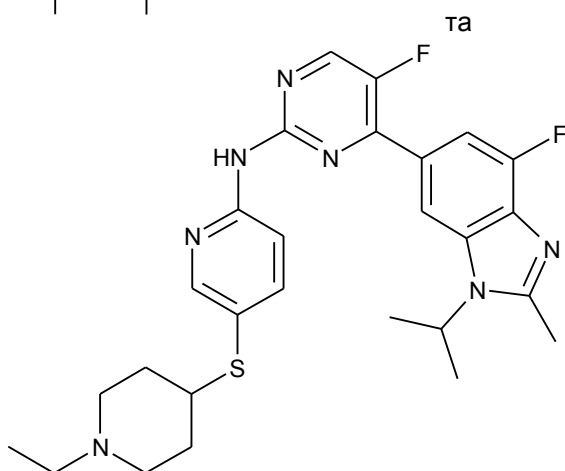
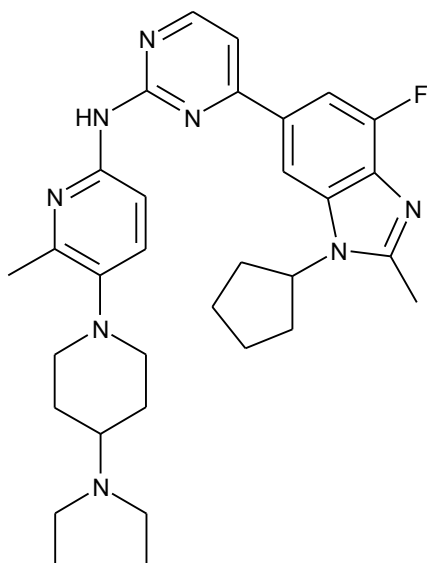
,



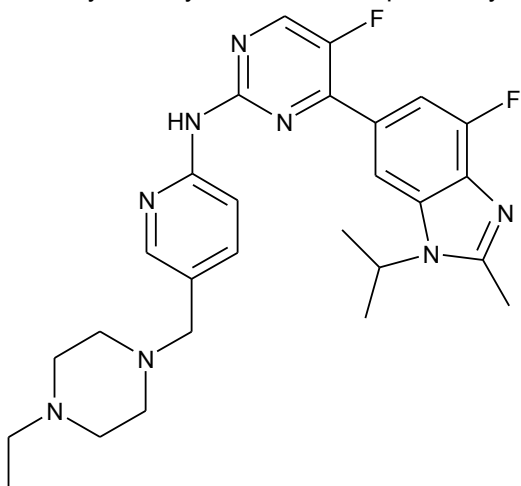
,



,



9. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів, яка являє собою:



5 або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки.

10. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів, яка являє собою мезилатну сіль.

11. Кристалічна форма III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну, яка характеризується порошковою рентгенодифрактограмою (джерело випромінення  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54056$  Å), яка містить пік при 21,29

10 (20±0,1°) та факультативно один або декілька піків, вибраних з групи, яка включає в себе 11,54, 10,91 та 12,13 (26±0,1°).

12. Кристалічна форма III [5-(4-етилпіперазин-1-ілметил)піридин-2-іл]-[5-фтор-4-(7-фтор-3-ізопропіл-2-метил-3Н-бензimidазол-5-іл)піримідин-2-іл]аміну за п. 11, яка також характеризується спектром  $^{13}\text{C}$  ЯМР, який містить піки хімічних зсувів  $\nu(\text{FI})$  [млн $^{-1}$ ] при 112,7, 127,3 та 129,4.
- 5 13. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки та фармацевтично прийнятні носій, розріджувач або допоміжну речовину.
14. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтично прийнятну сіль цієї сполуки, разом із фармацевтично прийнятним носієм та факультативно
- 10 іншими терапевтичними інгредієнтами.
15. Сполука за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки для застосування у терапії.
16. Сполука за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтично прийнятна сіль цієї сполуки для застосування у лікуванні раку, вибраного з групи, яку складають рак ободової та прямої кишки, рак молочної залози, рак легенів, рак простати, гліобластома, лімфома з клітин мантиї,
- 15 хронічний мієлоїдний лейкоз та гострий мієлоїдний лейкоз.

---

Комп'ютерна верстка С. Чулій

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601