



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115074** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

C07D 213/50 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 04700	(72) Винахідник(и):	Кунтц Кевін Уейн (US), Кемпбелл Джон Еммерсон (US), Секі Масасі (JP)
(22) Дата подання заявки:	15.10.2013	(73) Власник(и):	ЕПІЗАЙМ, ІНК., 400 Technology Square, 4th Floor, Cambridge, MA 02139, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.09.2017	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/714,145, 61/714,140, 61/780,703, 61/786,277	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2014/062720 A2; 24.04.2014 US 2012/0071418 A1; 22.03.2012 WO 2012/142513 A1; 18.10.2012 WO 2012/142504 A1; 18.10.2012 WO 2013/138361 A1; 19.09.2013
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.10.2012, 15.10.2012, 13.03.2013, 14.03.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.09.2015, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.09.2017, Бюл.№ 17		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2013/065126, 15.10.2013		

(54) БЕНЗОЛЬНІ СПОЛУКИ, ЩО МІСТЯТЬ ЗАМІСНИКИ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується бензольних сполук, що містять замісники. Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, що містять дані сполуки, та способів лікування раку шляхом введення даних сполук та фармацевтичних композицій суб'єктам, які потребують цього. Даний винахід також стосується застосування таких сполук для досліджень або інших нетерапевтичних цілей.

UA 115074 C2

СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка претендує на пріоритет та переваги на підставі попередньої заявки США №61/714140, поданої 15 жовтня 2012 року, №61/714145, поданої 15 жовтня 2012 року, №61/780703, поданої 13 березня 2013 року, та №61/786277, поданої 14 березня 2013 року.

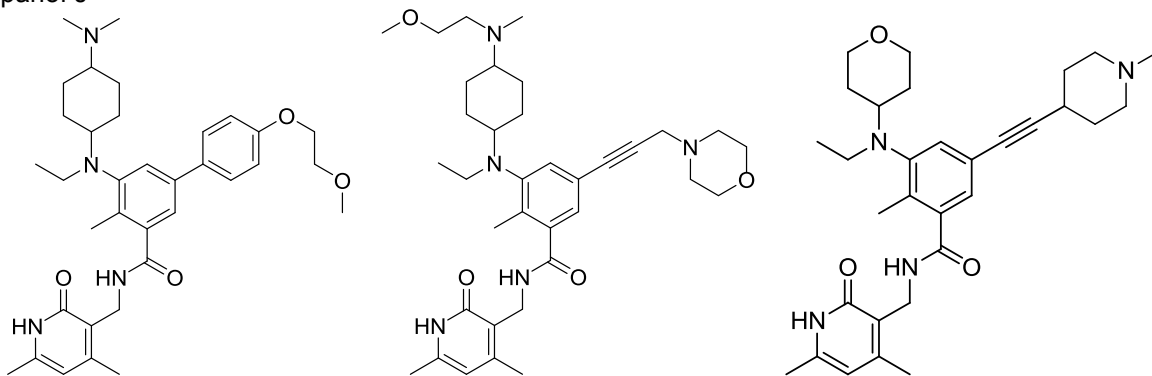
Повний зміст кожної з даних попередніх заявок включений в даний документ шляхом посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

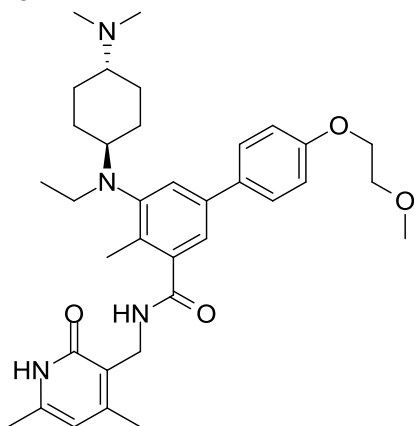
Зараз існує необхідність в розробці нових агентів як інгібіторів активності EZH2, які можна застосовувати для лікування EZH2-опосередкованого порушення (наприклад, раку).

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Один з аспектів даного винаходу стосується бензольної сполуки, що містить замісники, вибраної з

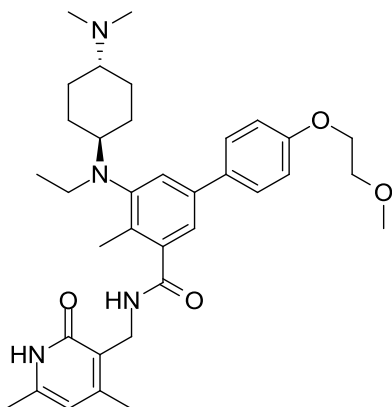


та їх фармацевтично прийнятних солей.

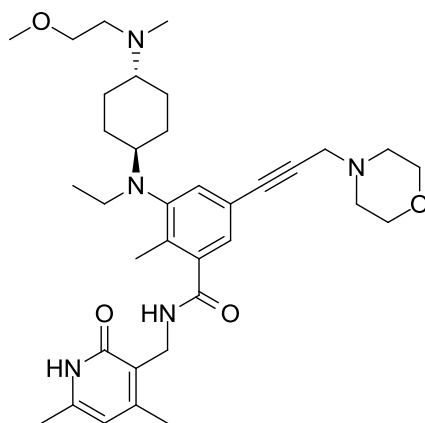


Наприклад, вказана сполука є прийнятною сіллю.

або його фармацевтично

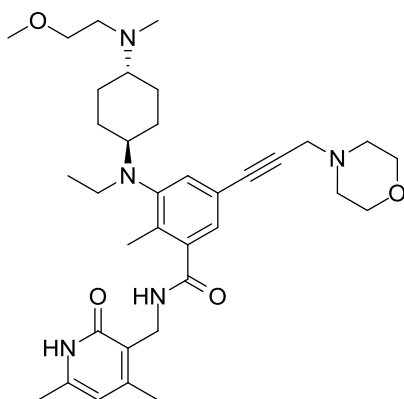


Наприклад, сполука є

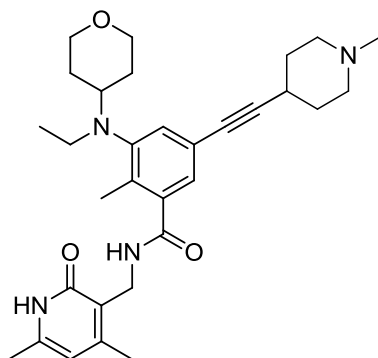


Наприклад, сполука є прийнятною сіллю.

або його фармацевтично

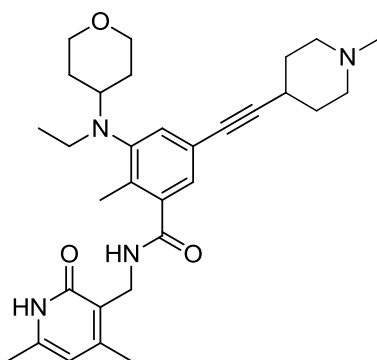


Наприклад, сполука є



Наприклад, сполука є сіллю.

або його фармацевтично прийнятною



Наприклад, сполука є

Згідно з даним винаходом також запропоновані фармацевтичні композиції, що містять один чи декілька фармацевтично прийнятних носіїв та одну чи декілька сполук, описаних в даному документі.

Інший аспект даного винаходу є способом лікування або запобігання EZH2-опосередкованого порушення. Вказаний спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості однієї чи декількох сполук, описаних в даному документі. EZH2-опосередковане порушення є захворюванням, порушенням або станом, які

принаймні почасти опосередковуються активністю EZH2. В одному з варіантів реалізації EZH2-опосередковане порушення пов'язане з підвищеною активністю EZH2. В одному з варіантів реалізації EZH2-опосередковане порушення є раком. EZH2-опосередкований рак може бути лімфомою, лейкозом або меланомою, наприклад, дифузною великоклітинною В-клітинною лімфомою (ДВВЛ), неходжкінською лімфомою (НХЛ), фолікулярною лімфомою, хронічним мієлогенним лейкозом (ХМЛ), гострим мієлоїдним лейкозом, гострим лімфоцитарним лейкозом, недиференційованим лейкозом або мієлодиспластичними синдромами (МДС). В одному з варіантів реалізації EZH2-опосередкований рак може бути злоякісною рабдоїдною пухлиною або пухлиною з дефіцитом INI1. Гістологічний діагноз злоякісної рабдоїдної пухлини залежить від ідентифікації характерних рабдоїдних клітин (великі клітини з ексцентрично розташованими ядрами та великою кількістю еозинофільної цитоплазми) та імуногістохімії з антитілами до віментину, кератину та епітеліального мембранного антигену. В більшості злоякісних рабдоїдних пухлин ген SMARCB1/INI1, розташований в сегменті хромосоми 22q11.2, інактивований внаслідок делецій та/або мутацій. В одному з варіантів реалізації злоякісні рабдоїдні пухлини можуть бути пухлиною з дефіцитом INI1.

Якщо не вказане інше, будь-який опис способу лікування включає застосування сполук для забезпечення такого лікування або профілактики, як вказано в даному описі, а також застосування сполук для одержання лікарського засобу для лікування або запобігання такого стану. Вказане лікування включає лікування тварин, які є людиною або не є людиною, включаючи гризунів, та інших моделей захворювань.

Більш того, сполуки або способи, описані в даному документі, можна застосовувати для досліджень (наприклад, досліджень епігенетичних ферментів) та для інших нетерапевтичних цілей.

В деяких варіантах реалізації кращі сполуки, описані в даному документі, мають бажані фармакологічні та/або фармакокінетичні властивості, наприклад, мають низькі швидкості кліренсу та/або обмежений ризик небажаних взаємодій лікарських засобів в комбінованій терапії, оцінюваний, наприклад, за залежним від часу та оборотним інгібуванням ферментів системи цитохрому Р-450.

Якщо не визначено інше, усі технічні та наукові терміни, використовувані в даному описі, мають такі значення, які звичайно зрозумілі фахівцю в галузі техніки, до якої належить даний винахід. В даному описі форми однини також включають множину об'єктів, якщо в контексті явно не вказано інше. Назважаючи на те, що при практичному застосуванні або тестуванні даного винаходу можна використовувати способи та речовини, аналогічні або еквівалентні описаним в даному документі, нижче описані придатні способи та речовини. Зміст усіх публікацій, заявок на патент, патентів та інших джерел, згаданих в даному документі, включений шляхом посилання. Джерела, вказані в даному описі, не вважаються рівнем техніки по відношенню до винаходу, що заявляється. У випадку протиріччя даний опис, включаючи визначення, буде мати переважну силу. Крім того, речовини, способи та приклади наведені лише як ілюстрації та не є обмежувачими. У випадку протиріч між хімічними структурами та назвами сполук, описаних в даному документі, хімічні структури будуть мати переважну силу.

Інші ознаки та переваги даного винаходу будуть очевидні виходячи з наведеного далі детального опису та формули винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг.1 є графіком, що демонструє протипухлинну дію перорально введеної сполуки 1 або сполуки А по відношенню до ксенотрансплантата лімфоми KARPAS-422 у мишей. Дані представлені як середні значення \pm SD (n = 10).

Фіг.2 є графіком, що демонструє вплив сполуки 1 або сполуки А на масу тіла миші. Дані представлені як середні значення \pm SD (n = 10).

Фіг.3 є графіком, що демонструє концентрацію сполуки 1 в пухлині на 7 день або 28 день після лікування або концентрацію сполуки А в пухлині на 7 день після лікування. На даній фігурі «А» - «Г» позначають 7 днів після введення сполуки 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; «Н» та «І» позначають 7 днів після введення сполуки А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно; і «J» - «L» позначають 28 днів після введення сполуки 1 в дозах, що складають 62,5, 125 та 250 мг/кг, відповідно.

Фіг.4 є графіком, що демонструє концентрацію сполуки 1 або сполуки А в плазмі крові на 7 день або 28 день після лікування. Верхня пунктирна лінія показує найменшу цитотоксичну концентрацію (LCC) сполуки А з поправкою на зв'язування з білками плазми крові (PPB), а нижня пунктирна лінія показує LCC сполуки 1 з поправкою на PPB.

Фіг.5 є графіком, що демонструє глобальне метилування H3K27me3 в пухлинах KARPAS-422 у мишей, яких лікували сполукою 1 або сполукою А протягом 7 днів. На даній фігурі «А»

позначає лікування носієм; «В» - «Н» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; і «І» та «J» позначають лікування сполукою А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно.

5 Фіг.6 є графіком, що демонструє глобальне метилування Н3К27ме3 в пухлинах KARPAS-422 у мишей, яких лікували сполукою 1 протягом 28 днів.

10 Фіг.7 є графіком, що демонструє глобальне метилування Н3К27ме3 в кістковому мозку мишей з ксенотрансплантатними пухлинами KARPAS-422, яких лікували сполукою 1 або сполукою А протягом 7 днів. На даній фігурі «А» позначає лікування носієм; «В» - «Н» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; і «І» та «J» позначають лікування сполукою А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно.

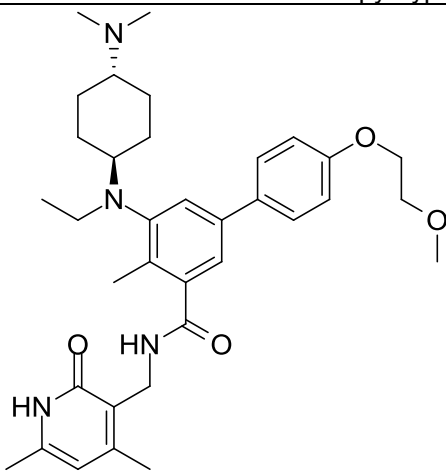
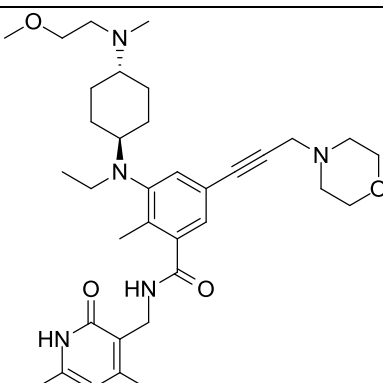
15 Фіг.8 є графіком, що демонструє глобальне метилування Н3К27ме3 в кістковому мозку мишей з ксенотрансплантатними пухлинами KARPAS-422, яких лікували сполукою 1 протягом 28 днів. На даній фігурі «А» позначає лікування носієм; «В» - «Е» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 125, 250 та 500 мг/кг, відповідно; і «F» позначає лікування сполукою А в дозі, що складає 250 мг/кг.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

20 Згідно з даним винаходом запропоновані нові бензольні сполуки, що містять замісники, способи синтезу для одержання вказаних сполук, що містять їх фармацевтичні композиції та різні способи застосування вказаних сполук.

Типові сполуки згідно з даним винаходом включають сполуки, перелічені в таблиці 1.

Таблиця 1

№ сполуки	Структура
1	
2	

Таблиця 1

№ сполуки	Структура
105	

В даному описі структурна формула сполуки в деяких випадках для зручності зображує певний ізомер, але даний винахід може включати усі ізомери, такі як геометричні ізомери, оптичні ізомери на основі асиметричного атома вуглецю, стереоізомери, таутомери, енантіомери, ротамери, діастереомери, рацемати тощо, при цьому зрозуміло, що не усі ізомери можуть мати однаковий рівень активності. Крім того, для сполук, представлених формулою, може бути характерним кристалічний поліморфізм. Слід відзначити, що будь-яка кристалічна форма, суміш кристалічних форм або її ангідрид чи гідрат входять до обсягу даного винаходу.

Термін «ізомерія» означає сполуки, які мають однакові молекулярні формули, але відрізняються послідовністю зв'язування атомів або розташуванням атомів у просторі. Ізомери, які відрізняються розташуванням атомів в просторі, називаються «стереоізомерами». Стереоізомери, які не є дзеркальними відображеннями одна одної, називаються «діастереоізомерами», і стереоізомери, які є ненакладними дзеркальними відображеннями одна одної, називаються «енантіомерами» або інколи оптичними ізомерами. Суміш, що містить рівні кількості окремих енантіомерних форм з протилежною хіральністю, називається «рацемічною сумішшю».

Термін «геометричний ізомер» означає діастереомери, існування яких обумовлено ускладненим обертанням навколо подвійних зв'язків або циклоалкільного лінкера (наприклад, 1,3-циклобутил). Дані конфігурації відрізняються в назвах приставками «цис» та «транс», або Z та E, які вказують на те, що групи перебувають з одного боку або з різних боків від подвійного зв'язку в молекулі згідно з правилами Кана-Інгольда-Прелога (Cahn-Ingold-Prelog).

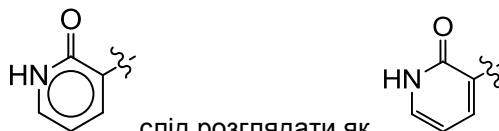
Слід розуміти, що сполуки згідно з даним винаходом можуть бути зображені у вигляді стереоізомерів. Слід також розуміти, що, коли сполуки мають стереоізомерні форми, усі стереоізомерні форми входять до обсягу даного винаходу, при цьому зрозуміло, що не усі стереоізомери можуть мати однаковий рівень активності.

Крім того, структури та інші сполуки, що розглядаються в даному винаході, включають усі їх атропоізомери, при цьому зрозуміло, що не усі атропоізомери можуть мати однаковий рівень активності. «Атропоізомери» є типом стереоізомера, в якому атоми двох ізомерів по-різному розташовані в просторі. Існування атропоізомерів обумовлено обмеженням обертанням, викликаним ускладненням обертання великих груп навколо центрального зв'язку. Такі атропоізомери, як правило, існують у вигляді суміші, однак завдяки останнім досягненням в галузі методів хроматографії в окремих випадках стало можливим розділення сумішей двох атропоізомерів.

«Таутомер» є одним з двох чи декількох структурних ізомерів, які існують у рівновазі, та легко перетворюється з однієї ізомерної форми на іншу. Дане перетворення приводить до формального перенесення атома водню, яке супроводжується переходом сусідніх спряжених подвійних зв'язків. Таутомери існують у вигляді суміші набору таутомерів в розчині. В розчинах, де можлива таутомеризація, буде досягатися хімічна рівновага таутомерів. Точне співвідношення таутомерів залежить від декількох факторів, включаючи температуру, розчинник та pH. Поняття таутомерів, які є взаємоперетворюваними в результаті таутомеризації, називається таутомерією.

З різних можливих типів таутомерії звичайно спостерігають два. У випадку кето-енольної таутомерії відбувається одночасний зсув електронів та атома водню. Кільчасто-ланцюгова таутомерія є результатом реакції альдегідної групи (-CHO) в ланцюговій молекулі цукру з однією з гідроксильних груп (-OH) в тій самій молекулі з утворенням циклічної (кільцевої) форми,

демонстрованої глюкозою.



В даному описі будь-який випадок слід розглядати як

Звичайними таутомерними парами є: кетон-енол, амід-нітрил, лактам-лактим, таутомерія амід-імідокислота в гетероциклічних кільцях (наприклад, в нуклеотидних основах, таких як гуанін, тимін та цитозин), імін-енамін та енамін-енамін. Прикладом кето-енольної рівноваги є рівновага між піридин-2(1H)-онами та відповідними піридин-2-олами, як показано нижче.



Слід розуміти, що сполуки згідно з даним винаходом можуть бути зображені у вигляді різних таутомерів. Слід також розуміти, що, коли сполуки мають таутомерні форми, усі таутомерні форми входять до обсягу даного винаходу, та назва сполук не виключає будь-яку таутомерну форму. Очевидно, що деякі таутомери можуть мати більш високий рівень активності, ніж інші.

Термін «кристалічні поліморфи», «поліморфи» або «кристалічні форми» означає кристалічні структури, в які сполука (или її сіль чи сольват) може кристалізуватися з різною кристалічною упаковкою при одному й тому самому елементному складі. Різні кристалічні форми звичайно мають різні рентгенівські дифрактограми, інфрачервоні спектри, температури плавлення, густину, твердість, форму кристалів, оптичні та електричні властивості, стабільність та розчинність. Розчинник для перекристалізації, швидкість кристалізації, температура зберігання та інші фактори можуть викликати переважання однієї кристалічної форми. Кристалічні поліморфи сполук можуть бути одержані шляхом кристалізації в різних умовах.

Сполуки згідно з даним винаходом включають власне сполуки, такі як сполуки будь-якої з формул, описаних в даному документі. Сполуки згідно з даним винаходом можуть також включати їх солі та їх сольвати при необхідності. Сіль, наприклад, може бути утворена між аніоном та позитивно зарядженою групою (наприклад, аміно) в бензольній сполуці, що містить замісники. Придатні аніони включають хлорид, бромід, йодид, сульфат, бісульфат, сульфамат, нітрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, саліцилат, лактат, нафталінсульфонат та ацетат (наприклад, трифторацетат). Термін «фармацевтично прийнятний аніон» стосується аніона, придатного для утворення фармацевтично прийнятної солі. Крім того, сіль також може бути утворена між катіоном та негативно зарядженою групою (наприклад, карбоксилатом) в бензольній сполуці, що містить замісники. Придатні катіони включають іон натрію, іон калію, іон магнію, іон кальцію та катіон амонію, такий як іон тетраметиламонію. Бензольні сполуки, що містять замісники, також включають солі, що містять четвертинні атоми азоту.

Крім того, сполуки згідно з даним винаходом, наприклад, солі вказаних сполук, можуть існувати чи то в гідратованій, чи то в негідратованій (безводній) формі, чи то у вигляді сольватів з молекулами іншого розчинника. Необмежуючі приклади гідратів включають моногідрати, дигідрати і т.д. Необмежуючі приклади сольватів включають етанольні сольвати, ацетонові сольвати і т.д.

Термін «сольват» означає форми приєднання розчинника, які містять чи то стехіометричні, чи то нестехіометричні кількості розчинника. Деякі сполуки схильні утримувати фіксоване молярне співвідношення молекул розчинника в твердому кристалічному стані, таким чином утворюючи сольват. Якщо розчинником є вода, то утворюваний сольват є гідратом; і якщо розчинником є спирт, то утворюваний сольват є алкоголятом. Гідрати утворюються шляхом комбінації однієї чи декількох молекул води з однією молекулою речовини, причому вода зберігає свій молекулярний стан у вигляді H₂O.

В даному описі термін «аналог» стосується хімічної сполуки, яка є структурно схожою з іншою сполукою, але дещо відрізняється за складом (як у випадку заміни одного атома атомом іншого елемента або у випадку присутності конкретної функціональної групи, або заміни однієї функціональної групи іншою функціональною групою). Таким чином, аналог є сполукою, схожою або порівнянною за функцією та зовнішнім виглядом, але не по структурі або походженню, з вихідною сполукою.

В даному описі термін «похідне» стосується сполук, які мають спільну базову структуру та містять як замісники різні групи, описані в даному документі. Наприклад, усі сполуки в таблиці 1

є бензольними сполуками, що містять замісники та мають спільну базову основу.

Термін «біоізомер» стосується сполуки, яка утворюється в результаті заміни атома або групи атомів іншим схожим в широкому розумінні атомом або групою атомів. Задачею біоізомеричної заміни є одержання нової сполуки, що має біологічні властивості, схожі з вихідною сполукою. Біоізомерична заміна може бути на фізико-хімічній або топологічній основі. Приклади біоізомерів карбонових кислот включають, без обмеження ними, ацилсульфоніміди, тетразоли, сульфонати та фосфонати. Див., наприклад, Patani and LaVoie, *Chem. Rev.* 96, 3147-3176, 1996.

Даний винахід включає усі ізотопи атомів, що зустрічаються в сполуках згідно з даним винаходом. Ізотопи включають такі атоми, які мають однаковий атомний номер, але різні масові числа. Як загальний приклад та без обмеження, ізотопи водню включають тритій та дейтерій, а ізотопи вуглецю включають C-13 та C-14.

Згідно з даним винаходом запропоновані способи синтезу сполук, описаних в даному документі. Згідно з даним винаходом також запропоновані детально розглянуті способи синтезу різних описаних сполук згідно з даним винаходом відповідно до схем, представлених в розділі «Приклади».

У всьому даному описі у випадку, коли композиції описані як такі, що мають, включають або містять конкретні компоненти, передбачається, що композиції також складаються або по суті складаються з перелічених компонентів. Так само, у випадку, коли методи або способи описані як такі, що мають, включають або містять конкретні етапи способу, вказані способи також складаються або по суті складаються з перелічених етапів способів. Крім того, слід розуміти, що порядок етапів або порядок виконання певних дій не має значення, якщо даний винахід залишається реалізовним. Більш того, два чи більше етапів або дій можна здійснювати одночасно.

Способи синтезу згідно з даним винаходом можуть припускати широкий спектр функціональних груп, тому можна використовувати різні вихідні речовини, що містять замісники. Вказані способи, в цілому, дозволяють одержати бажану кінцеву сполуку в кінці або наприкінці загального способу, хоча в деяких випадках може бути бажаним подальше перетворення сполуки на її фармацевтично прийнятну сіль.

Сполуки згідно з даним винаходом можуть бути одержані різними способами з використанням комерційно доступних вихідних речовин, сполук, відомих в літературі, або з легко одержуваних проміжних сполук шляхом використання стандартних способів та процедур синтезу, які чи то відомі фахівцю в даній галузі техніки, чи то будуть очевидні фахівцю в даній галузі техніки у світлі ідей, описаних в даному документі. Стандартні способи та процедури синтезу для одержання органічних молекул і трансформацій та маніпуляцій з функціональними групами можна знайти у відповідній науковій літературі або в стандартних посібниках в даній галузі. Незважаючи на відсутність обмежень будь-яким одним чи декількома джерелами, класичні посібники, такі як Smith, M. B., March, J., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); та L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), зміст яких включений в даний опис шляхом посилання, є корисними та загальнопризнаними еталонними посібниками з органічного синтезу, відомими фахівцю в даній галузі техніки. Наведений далі опис способів синтезу призначений для ілюстрації, а не для обмеження, загальних процедур одержання сполук згідно з даним винаходом.

Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що для деяких груп може бути необхідний захист від умов реакцій шляхом використання захисних груп. Захисні групи можна також використовувати для розрізнення схожих функціональних груп в молекулах. Перелік захисних груп та способи введення та видалення даних груп можна знайти в Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999.

Кращі захисні групи включають, без обмеження ними:

Для гідроксильної групи: TBS, бензил, THP, Ac

Для карбонових кислот: складний бензиловий ефір, складний метиловий ефір, складний етиловий ефір, складний аліловий ефір

Для амінів: Cbz, BOC, DMB

Для діолів: Ac (×2) TBS (×2) або для узятих разом - ацетоніди

Для тіолів: Ac

Для бензимидазолів: SEM, бензил, PMB, DMB

Для альдегідів: діалкілацеталі, такі як диметоксіяцеталь або діетилацетил.

В схемах реакцій, описаних в даному документі, може бути одержано декілька стереоізомерів. Коли не вказаний конкретній стереоізомер, слід розуміти усі можливі стереоізомери, які можуть бути одержані в результаті реакції. Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що реакції можуть бути оптимізовані для одержання одного кращого ізомеру, або можуть бути розроблені нові схеми для одержання одного ізомеру. Якщо одержують суміші, для розділення ізомерів можуть бути використані такі методи, як препаративна тонкошарова хроматографія, препаративна ВЕРХ, препаративна хіральна ВЕРХ або препаративна надкритична рідинна хроматографія (SFC).

В усьому даному описі використовуються такі скорочення, які визначені нижче:

Ас ацетил

АсОН оцтова кислота

водн. водний

BID або b.i.d. bis in die (два рази на добу)

BOC трет-бутоксикарбоніл

Cbz бензилоксикарбоніл

CDCl₃ дейтерований хлороформ

CH₂Cl₂ дихлорметан

ДХМ дихлорметан

DMB 2,4-диметоксибензил

ДМФА N,N-диметилформамід

ДМСО диметилсульфоксид

ЕА або EtOAc етилацетат

EDC або EDCI N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімід

ESI-електророзпилення, режим визначення негативних іонів

ESI+ електророзпилення, режим визначення позитивних іонів

EtOH етанол

год. години

H₂O вода

HOBT 1-гідроксибензотриазол

HCl хлористий водень або хлористоводнева кислота

ВЕРХ високоефективна рідинна хроматографія

K₂CO₃ карбонат калію

ЖХ/МС або ЖХ-МС рідинна хроматографія-мас-спектрометрія

M молярний

MeCN ацетонітрил

хв. хвилини

Na₂CO₃ карбонат натрію

Na₂SO₄ сульфат натрію

NaHCO₃ бікарбонат натрію

NaHMDs гексаметилдисилазид натрію

NaOH гідроксид натрію

NaHCO₃ бікарбонат натрію

Na₂SO₄ сульфат натрію

ЯМР ядерний магнітний резонанс

Pd(OH)₂ дигідроксид паладію

PMB пара-метоксибензил

p.o. per os (пероральне введення)

ppm частин на мільйон

преп. ВЕРХ препаративна високоефективна рідинна хроматографія

РУБОР (бензотриазол-1-ілокси)трипіролідінфосфонію

гексафторфосфат

Кт або КТ кімнатна температура

МТБЕ метил-трет-бутиловий ефір

ТФОК трифтороцтова кислота

ТГФ тетрагідрофуран

ТНР тетрагідропіран

Сполуки згідно з даним винаходом можна зручно одержувати різними способами, відомими фахівцю в даній галузі техніки. Сполуки згідно з даним винаходом з будь-якою формулою, описаною в даному документі, можуть бути одержані згідно з процедурами, проілюстрованими в

наведених нижче прикладах, з комерційно доступних вихідних речовин або вихідних речовин, які можуть бути одержані з використанням процедур, описаних в літературі.

Фахівцю в даній галузі техніки слід відзначити, що у випадку послідовностей реакцій та схем синтезу, описаних в даному документі, порядок деяких етапів може бути змінений, наприклад, введення та видалення захисних груп.

Сполуки згідно з даним винаходом інгібують гістонметилтрансферазну активність EZH2 або його мутанта і, відповідно, згідно з одним з аспектів даного винаходу, деякі сполуки, описані в даному документі, є кандидатами для лікування або запобігання деяких станів та захворювань, при яких EZH2 відіграє певну роль. Згідно з даним винаходом запропоновані способи лікування станів та захворювань, на перебіг яких можна впливати шляхом модуляції статусу метилування гістонів або інших білків, при цьому вказаний статус метилування опосередковується принаймні часті активністю EZH2. Модуляція статусу метилування гістонів може в свою чергу впливати на рівень експресії цільових генів, активованих шляхом метилування, та/або цільових генів, пригнічуваних шляхом метилування. Вказаний спосіб включає введення суб'єкту, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки згідно з даним винаходом або її фармацевтично прийнятної солі, поліморфа, сольвату або стереоізомера.

Якщо не вказане інше, будь-який опис способу лікування включає застосування сполук для забезпечення такого лікування або профілактики, як вказано в даному описі, а також застосування сполук для одержання лікарського засобу для лікування або запобігання такого стану. Вказане лікування включає лікування тварин, що належать до людини або не належать до людей, включаючи гризунів, та інших моделей захворювань.

Інший аспект даного винаходу стосується способу модулювання активності EZH2, каталітичної субодиниці комплексу PRC2, яка каталізує від моно- до триметилування лізину 27 в гістоні H3 (H3-K27), у суб'єкта, що потребує цього. Наприклад, вказаний спосіб включає етап введення суб'єкту, хворому на рак, що експресує мутантний EZH2, терапевтично ефективної кількості сполуки, описаної в даному документі, при цьому вказана сполука (сполуки) інгібують гістонметилтрансферазну активність EZH2, здійснюючи тим самим лікування раку.

Наприклад, EZH2-опосередковуваний рак вибраний з групи, що складається з фолікулярної лімфоми та дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми (ДВВЛ) підтипу, який є лімфомою з В-клітин гермінативного центра (germinal center B cell-like subtype, GCB). Наприклад, рак є лімфомою, лейкозом або меланомою. Краще, лімфома є неходжкінською лімфомою (НХЛ), фолікулярною лімфомою або дифузною великоклітинною В-клітинною лімфомою. Як альтернатива, лейкоз є хронічним мієлогенним лейкозом (ХМЛ), гострим мієлоїдним лейкозом, гострим лімфоцитарним лейкозом або недиференційованим лейкозом.

Наприклад, EZH2-опосередковуваний передраковий стан є мієлодиспластичними синдромами (МДС, раніше відомі як передлейкоз).

Наприклад, EZH2-опосередковуваний рак є гематологічною злоякісною пухлиною.

Сполука (сполуки) згідно з даним винаходом інгібують гістонметилтрансферазну активність EZH2 або його мутанта і, відповідно, згідно з даним винаходом також запропоновані способи лікування станів та захворювань, на перебіг яких можна впливати шляхом модуляції статусу метилування гістонів або інших білків, при цьому вказаний статус метилування опосередковується принаймні часті активністю EZH2. Згідно з одним з аспектів даного винаходу деякі сполуки, описані в даному документі, є кандидатами для лікування або запобігання деяких станів та захворювань. Модуляція статусу метилування гістонів може в свою чергу впливати на рівень експресії цільових генів, активованих шляхом метилування, та/або цільових генів, пригнічуваних шляхом метилування. Вказаний спосіб включає введення суб'єкту, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки згідно з даним винаходом.

В даному описі терміни «суб'єкт» та «суб'єкт, що потребує цього», є взаємозамінними та обидва стосуються суб'єкта, хворого на порушення, при якому EZH2-опосередковуване метилування білка відіграє певну роль, або суб'єкта, що зазнає підвищеного ризику розвитку такого порушення порівняно з населенням в цілому. Термін «суб'єкт» включає ссавця. Вказаний ссавець може бути, наприклад, людиною або придатним ссавцем, що не є людиною, таким як примат, миша, щур, собака, кішка, корова, кінь, коза, верблюд, вівця або свиня. Суб'єкт може також бути птахом або домашньою птицею. В одному з варіантів реалізації ссавець є людиною. Суб'єкт, що потребує цього, може бути суб'єктом, у якого раніше був діагностований або визначений рак або передраковий стан. Суб'єкт, що потребує цього, може також бути суб'єктом, що має рак або передраковий стан (наприклад, хворіє). Як альтернатива, суб'єкт, що потребує цього, може бути суб'єктом, що зазнає підвищеного ризику розвитку такого порушення порівняно з населенням в цілому (тобто суб'єкт, схильний до розвитку такого порушення

порівняно з населенням в цілому). Суб'єкт, що потребує цього, може потерпати від передракового стану. Суб'єкт, що потребує цього, може хворіти раком, що не піддається лікуванню, або резистентним раком (тобто раком, який не відповідає або ще не відповів на лікування). Суб'єкт може бути несприйнятливим на початку лікування або може стати несприйнятливим під час лікування. В деяких варіантах реалізації суб'єкт, що потребує цього, демонструє рецидив раку після ремісії в процесі останньої терапії. В деяких варіантах реалізації суб'єкт, що потребує цього, отримувал і на нього не подіяли усі відомі ефективні види терапії для лікування раку. В деяких варіантах реалізації суб'єкт, що потребує цього, отримувал принаймні одну попередню терапію. В кращому варіанті реалізації суб'єкт хворіє на рак або раковий стан. Наприклад, рак є лімфомою, лейкозом, меланомою або рабдоміосаркомою. Краще, лімфома є неходжкінською лімфомою, фолікулярною лімфомою або дифузною великоклітинною В-клітинною лімфомою. Як альтернатива, лейкоз є хронічним мієлогенним лейкозом (ХМЛ). Передраковий стан є мієлодиспластичними синдромами (МДС, раніше відомі як передлейкоз).

В даному описі термін «лікування» або «лікувати» описує надання допомоги та догляд за пацієнтом з метою боротьби із захворюванням, станом або порушенням, і включає введення сполуки згідно з даним винаходом або її фармацевтично прийнятної солі, поліморфа або сольвату для полегшення симптомів або ускладнень захворювання, стану чи порушення, або для усунення вказаного захворювання, стану чи порушення. Термін «лікувати» може також включати обробку клітини *in vitro* або лікування моделі у тварини.

Сполуку згідно з даним винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль, поліморф або сольват можна або також можна застосовувати для запобігання відповідного захворювання, стану чи порушення, або застосовувати для ідентифікації придатних кандидатів для даних цілей. В даному описі термін «запобігання», «запобігати» або «захист від» описує зменшення або усунення появи симптомів або ускладнень такого захворювання, стану чи порушення.

Існують дані про те, що точкові мутації гена EZH2 в одному амінокислотному залишку (наприклад, Y641, A677 та A687) EZH2 зв'язані з лімфомою. Додаткові приклади мутантів EZH2 та способів детектування мутації, і способів лікування порушень, пов'язаних з мутаціями, описані, наприклад, в публікації заявки на патент США № US 20130040906, повний зміст якої включений до даного опису шляхом посилання.

Фахівець в даній галузі техніки може звернутися до загальних еталонних посібників для детального опису відомих методів, розглянутих в даному документі, або еквівалентних методів. Дані посібники включають Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna *et al.*, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990). До даних посібників можна, звичайно, також звертатися при одержанні або використанні аспекта даного винаходу.

В даному описі термін «комбінована терапія» або «спільна терапія» включає введення сполуки згідно з даним винаходом або її фармацевтично прийнятної солі, поліморфа чи сольвату та принаймні другого агента в рамках конкретної схеми лікування, спрямованої на забезпечення корисного ефекту в результаті спільної дії даних терапевтичних агентів. Корисний ефект такої комбінації включає, без обмеження ними, фармакокінетичну або фармакодинамічну спільну дію, обумовлену комбінацією терапевтичних агентів.

Згідно з даним винаходом також запропоновані фармацевтичні композиції, що містять сполуку, описану в даному документі, в комбінації принаймні з однією фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною або носієм.

«Фармацевтична композиція» є сумішшю, що містить сполуки згідно з даним винаходом у формі, придатній для введення суб'єкту. В одному з варіантів реалізації фармацевтична композиція представлена в нерасфасованій формі або в одиничній лікарській формі. Одинична лікарська форма є будь-якою з множини форм, включаючи, наприклад, капсулу, пакет для внутрішньовенного введення, таблетку, дозований картридж в аерозольному інгаляторі або флакон. Кількість активного інгредієнта (наприклад, суміші описаної сполуки або її солі, гідрату, сольвату або ізомеру) в однократній дозі композиції є ефективною кількістю та варіюється згідно з конкретним застосовуваним лікуванням. Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що інколи необхідно проводити звичайні зміни дози в залежності від віку та стану пацієнта. Доза буде також залежати від шляху введення. Предбачені різні шляхи, включаючи пероральний, легеневий, ректальний, парентеральний, трансдермальний, підшкірний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, інтраперитонеальний, інгаляційний, трансбуккальний, сублінгвальний,

внутрішньоплевральний, інтратекальний, інтраназальний тощо. Лікарські форми для топічного або трансдермального введення сполуки згідно з даним винаходом включають порошки, спреї, мазі, пасти, креми, лосьйони, гелі, розчини, пластири та препарати для інгаляції. В одному з варіантів реалізації активна сполука змішано в стерильних умовах з фармацевтично прийнятним носієм та з будь-якими консервантами, буферами або пропелентами, що є необхідними.

В даному описі термін «фармацевтично прийнятний» стосується сполук, аніонів, катіонів, речовин, композицій, носіїв та/або лікарських форм, які з медичної точки зору придатні для застосування в контакт з тканинами людей та тварин, не викликаючи при цьому надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми чи ускладнення, згідно з розумним співвідношенням користь/ризик.

Термін «фармацевтично прийнятна допоміжна речовина» означає допоміжну речовину, яка є придатною для одержання фармацевтичної композиції, яка є в цілому безпечною, нетоксичною та не є ані біологічно, ані в іншому відношенні небажаною, і включає допоміжну речовину, прийнятну для застосування в ветеринарії, а також для застосування у фармацевтиці. В даному описі та формулі винаходу термін «фармацевтично прийнятна допоміжна речовина» включає як одну, так і декілька таких допоміжних речовин.

Фармацевтичну композицію згідно з даним винаходом виготовляють таким чином, щоб вона була сумісною з гаданим шляхом введення. Приклади шляхів введення включають парентеральне, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньошкірне, підшкірне, пероральне (наприклад, інгаляційне), трансдермальне (топічне) введення та введення через слизову. Розчини або суспензії, використовувані для парентерального, внутрішньошкірного або підшкірного застосування, можуть містити такі компоненти: стерильний розріджувач, такий як вода для ін'єкцій, фізіологічний розчин, нелеткі масла, поліетиленгліколі, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники; антибактеріальні агенти, такі як бензиловий спирт або метилпарабени; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або бісульфіт натрію; хелатуючі агенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота; буфери, такі як ацетати, цитрати або фосфати, та агенти регулювання тонічності, такі як хлорид натрію або декстроза. рН можна регулювати кислотами або основами, такими як хлористоводнева кислота або гідроксид натрію. Препарат для парентерального введення може міститися в ампулах, одноразових шприцах або виготовлених зі скла або пластику флаконів, що містять декілька доз.

Сполуку або фармацевтичну композицію згідно з даним винаходом можна вводити суб'єкту багатьма добре відомими способами, використовуваними зараз для хіміотерапевтичного лікування. Наприклад, для лікування ракових пухлин сполуку згідно з даним винаходом можна вводити шляхом ін'єкції безпосередньо в пухлини, вводити шляхом ін'єкції в кровотік або порожнини тіла, або приймати перорально, або застосовувати через шкіру за допомогою пластрів. Вибрана доза повинна бути достатньою для забезпечення ефективного лікування, але не настільки високою, щоб викликати неприйнятні побічні ефекти. Краще, слід уважно спостерігати за перебігом захворювання (наприклад, раку, передракового стану тощо) та станом здоров'я пацієнта під час лікування та протягом розумного періоду часу після лікування.

В даному описі термін «терапевтично ефективна кількість» стосується кількості фармацевтичного агента для лікування, полегшення або запобігання визначеного захворювання чи стану, або для створення виявлюваного терапевтичного або інгібуючого ефекту. Вказаний ефект може бути виявлений за допомогою будь-якого методу аналізу, відомого в даній галузі техніки. Точна ефективна кількість для суб'єкта буде залежати від маси тіла, розмірів та стану здоров'я суб'єкта; характеру та ступеня стану; та лікарського засобу або комбінації лікарських засобів, вибраних для введення. Терапевтично ефективні кількості для конкретної ситуації можуть бути визначені шляхом проведення рутинних експериментів в межах компетенції та на розсуд лікаря-клініциста. Згідно з кращим аспектом захворювання або стан, який лікують, є раком. Згідно з іншим аспектом захворювання або стан, який лікують, є клітинним проліферативним порушенням.

Для будь-якої сполуки терапевтично ефективна кількість може бути первісно визначена чи то в аналізах культур клітин, наприклад, неопластичних клітин, чи то в моделях у тварин, як правило, щурів, мишей, кролів, собак або свиней. Тваринну модель можна також використовувати для визначення відповідного діапазону концентрацій та шляху введення. Таку інформацію потім можна використовувати для визначення придатних доз та шляхів введення у людей. Терапевтична/профілактична ефективність та токсичність можуть бути визначені за допомогою стандартних фармацевтичних процедур в культурах клітин або у експериментальних тварин, наприклад, ED₅₀ (доза, яка є терапевтично ефективною у 50% популяції) та LD₅₀ (доза, яка є летальною для 50% популяції). Співвідношення доз, що

відповідають токсичному та терапевтичному ефектам, є терапевтичним індексом, і він може бути виражений у вигляді співвідношення LD_{50}/ED_{50} . Кращими є фармацевтичні композиції, які демонструють більші терапевтичні індекси. Доза може варіювати в межах даного діапазону в залежності від використовуваної лікарської форми, чутливості пацієнта та шляху введення.

Дозу та введення коригують для забезпечення достатніх рівнів активного агента (агентів) або для підтримання бажаного ефекту. Фактори, які можна враховувати, включають тяжкість хворобливого стану, загальний стан здоров'я суб'єкта, вік, масу тіла та стать суб'єкта, харчування, час та частоту введення, комбінацію (комбінації) лікарських засобів, чутливість реакції та переносність/відповідь на терапію. Тривало діючі фармацевтичні композиції можна вводити кожні 3-4 дні, кожен тиждень або один раз на два тижні в залежності від періоду напіввиведення та швидкості кліренсу конкретної композиції.

Фармацевтичні композиції, що містять активні сполуки згідно з даним винаходом, можуть бути одержані загальновідомим способом, наприклад, за допомогою традиційних способів змішування, розчинення, гранулювання, виготовлення драже, розтирання в порошок, емульгування, інкапсулювання, захоплення або ліофілізації. Фармацевтичні композиції можуть бути одержані традиційним способом з використанням одного чи декількох фармацевтично прийнятних носіїв, що включають допоміжні речовини та/або додаткові речовини, які полегшують переробку активних сполук в препарати, придатні для фармацевтичного застосування. Відповідний склад, звичайно, залежить від вибраного шляху введення.

Фармацевтичні композиції, придатні для застосування шляхом ін'єкцій, включають стерильні водні розчини (у випадку розчинності у воді) або дисперсії та стерильні порошки для негайного приготування стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій. Для внутрішньовенного введення придатні носії включають фізіологічний розчин, бактеріостатичну воду, Cremophor ELTM (BASF, Парсіппані, Нью-Джерсі, США) або фосфатний буферний розчин (ФБР). В усіх випадках композиція повинна бути стерильною та текучою в такому ступені, щоб існувала можливість легкого введення через шприц. Вона повинна бути стабільною в умовах виготовлення та зберігання, та повинна бути захищена від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби. Носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь та рідкий поліетиленгліколь тощо) і придатні суміші вказаних речовин. Необхідна плинність може бути збережена, наприклад, шляхом використання покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання потрібного розміру частинок у випадку дисперсії та шляхом використання поверхнево-активних речовин. Запобігання дії мікроорганізмів може бути забезпечене різними антибактеріальними та протигрибковими агентами, наприклад, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбіновою кислотою, тимеросалом тощо. В багатьох випадках буде кращим включення в композицію ізотонічних агентів, наприклад, цукрів, поліспиртів, таких як маніт та сорбіт, та хлориду натрію. Пролонговану абсорбцію композицій для ін'єкцій можна забезпечити шляхом включення в композицію агента, який відтерміновує абсорбцію, наприклад, моностеарату алюмінію та желатину.

Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути приготовлені шляхом включення активної сполуки в потрібній кількості у відповідний розчинник разом з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, при необхідності, з подальшою стерилізацією шляхом фільтрації. Як правило, дисперсії готують шляхом включення активної сполуки в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище та інші потрібні інгредієнти з перелічених вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкцій способами одержання є вакуумне сушіння та сушіння методом сублимації, яке дозволяє одержати порошок активного інгредієнта, а також будь-якого бажаного додаткового інгредієнта з його попередньо стерилізованого шляхом фільтрації розчину.

Композиції для перорального введення, як правило, містять інертний розріджувач або придатний до застосування фармацевтично прийнятний носій. Дані композиції можуть бути поміщені в желатинові капсули або спресовані в таблетки. Для цілей перорального терапевтичного введення активну сполуку можна включати спільно з допоміжними речовинами та застосовувати у формі таблеток, пастилок або капсул. Композиції для перорального введення також можуть бути одержані з використанням рідкого носія для застосування у вигляді рідини для полоскання роту, у випадку якої сполуку в рідкому носії застосовують перорально для полоскання роту, з подальшим випльовуванням або проковтуванням. Фармацевтично сумісні зв'язуючі агенти та/або речовини, які є ад'ювантами, можуть бути включені в композицію як її частини. Таблетки, пілюлі, капсули, пастилки тощо можуть містити будь-який з таких інгредієнтів або сполук схожої природи: зв'язуюча речовина, така як мікрокристалічна целюлоза, трагакантова камедь або желатин; допоміжна речовина, така як крохмаль або

лактоза, розпушувач, такий як альгінова кислота, Примогель або кукурудзяний крохмаль; змащувальна речовина, така як стеарат магнію або Sterotes; речовина, що сприяє ковзанню, така як колоїдний діоксид кремнію; підсолоджувач, такий як сахароза чи сахарин; або ароматизатор, такий як перцева м'ята, метилсаліцилат або апельсиновий ароматизатор.

5 Для введення шляхом інгаляції сполуки доставляють у формі спрея-аерозолу з ємності, що перебуває під тиском або дозуючого пристрою, що містить придатний пропелент, наприклад, газ, такий як діоксид вуглецю, або розпилювача.

Системне введення можна також здійснювати через слизову або трансдермальним способом. Для введення через слизову або трансдермального введення в суміші 10 використовують проникні речовини, необхідні для проходження через відповідний бар'єр. Такі проникні речовини, в цілому, відомі в даній галузі техніки та включають, наприклад, для введення через слизову, детергенти, солі жовчних кислот та похідні фусидової кислоти. Введення через слизову можна здійснювати шляхом застосування назальних спреїв або супозиторіїв. Для трансдермального введення активні сполуки включають до складу мазей, 15 бальзамів, гелей або кремів, загальновідомих в даній галузі техніки.

Активні сполуки можуть бути одержані спільно з фармацевтично прийнятними носіями, які будуть захищати сполуку від швидкого виведення з організму, наприклад, у вигляді суміші з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти та мікроінкапсуловані системи доставки. Можуть бути використані біорозкладані біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, 20 поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, складні поліортоефіри та полімолочна кислота. Способи одержання таких сумішей очевидні фахівцю в даній галузі техніки. Вказані речовини також можуть бути придбані у Alza Corporation та Nova Pharmaceuticals, Inc. Ліпосомальні суспензії (включаючи ліпосоми, спрямовані на інфіковані клітини, з моноклональними антитілами до вірусних антигенів) також можна застосовувати як фармацевтично прийнятні носії. Вони можуть бути одержані згідно зі способами, відомими фахівцю в даній галузі техніки, 25 наприклад, описаними в патенті США №4522811.

Особливо кращим є одержання композицій для перорального або парентерального введення в одиничній лікарській формі для зручності введення та однорідності дози. В даному описі термін «одинична лікарська форма» стосується фізично розділених об'єктів, придатних 30 для використання як однократні дози для введення суб'єкту, якого лікують; причому кожна доза містить заздалегідь визначену кількість активної сполуки, розраховану таким чином, щоб забезпечити бажаний терапевтичний ефект, спільно з необхідним фармацевтичним носієм. Опис одиничних лікарських форм згідно з даним винаходом обумовлений та залежить безпосередньо від унікальних характеристик активної сполуки та конкретного терапевтичного ефекту, що досягається. 35

При терапевтичному застосуванні дози фармацевтичних композицій, застосовуваних згідно з даним винаходом, варіюються в залежності від агента, віку, маси тіла та клінічного стану пацієнта-реципієнта, і досвіду та рішення лікаря-клініциста або практикуючого лікаря, який 40 проводить терапію, поряд з іншими факторами, що впливають на вибрану дозу. В цілому, доза повинна бути достатньою для того, щоб привести до уповільнення та краще регресії росту пухлин, а також краще до повної регресії раку. Дози можуть перебувати в діапазоні від приблизно 0,01 мг/кг на добу до приблизно 5000 мг/кг на добу. Згідно з кращими аспектами дози можуть перебувати в діапазоні від приблизно 1 мг/кг на добу до приблизно 1000 мг/кг на добу. Згідно з одним з аспектів доза буде перебувати в діапазоні від приблизно 0,1 мг/добу до 45 приблизно 50 г/добу; від приблизно 0,1 мг/добу до приблизно 25 г/добу; від приблизно 0,1 мг/добу до приблизно 10 г/добу; від приблизно 0,1 мг до приблизно 3 г/добу; або від приблизно 0,1 мг до приблизно 1 г/добу, у вигляді однократних, розділених або неперервних доз (при цьому доза може бути скоригована з урахуванням маси тіла пацієнта в кг, площі поверхні тіла в м² та віку в роках). Ефективна кількість фармацевтичного агента є такою кількістю, що 50 забезпечує поліпшення, яке можна об'єктивно визначити, і яке спостерігається лікарем-клініцистом або іншим кваліфікованим спостерігачем. Наприклад, регресію пухлини у пацієнта можна виміряти на підставі діаметра пухлини. Зменшення діаметра пухлини вказує на регресію. На регресію також вказує відсутність повторної появи пухлин після припинення лікування. В даному описі термін «спосіб ефективної дози (dosage effective manner)» стосується кількості 55 активної сполуки для досягнення бажаної біологічної дії у суб'єкта або клітини.

Фармацевтичні композиції можуть бути поміщені в ємність, упаковку або дозатор разом з інструкціями з введення.

Сполуки згідно з даним винаходом є також здатними утворювати солі. Усі дані форми також передбачені в межах обсягу заявленого винаходу.

60 В даному описі термін «фармацевтично прийнятні соли» стосується похідних сполук згідно з

даним винаходом, в яких вихідна сполука модифікована шляхом одержання її кислих або основних солей. Приклади фармацевтично прийнятних солей включають, без обмеження ними, солі, утворені неорганічними або органічними кислотами з основними залишками, такими як аміни, лужні або органічні солі кислих залишків, таких як карбонові кислоти, тощо.

5 Фармацевтично прийнятні солі включають звичайні нетоксичні солі або четвертинні амонієві солі вихідної сполуки, одержані, наприклад, з нетоксичних неорганічних або органічних кислот. Наприклад, такі звичайні нетоксичні солі включають, без обмеження ними, солі, одержані з неорганічних та органічних кислот, вибраних з 2-ацетоксибензойної, 2-гідроксіетансульфонової, оцтової, аскорбінової, бензолсульфонової, бензойної, бікарбонної, вугільної, лимонної, етилендіамінтетраоцтової, етандисульфонової, 1,2-етансульфонової, фумарової, глюконової, глюконової, глутамінової, гліколевої, гліколіларсанілової, гексилрезорцинової, гідрабамінової, бромистоводневої, хлористоводневої, йодистоводневої, гідроксималеїнової, гідроксинафтоїної, ізетіонової, молочної, лактобіонової, лаурилсульфонової, малеїнової, яблучної, мигдалевої, метансульфонової, напсилової (napsylic), азотної, щавлевої, памової, пантотенової, фенілоцтової, фосфорної, полігалактуронової, пропіонової, саліцилової, стеаринової, підоцтової (subacetic), бурштинової, сульфамінової, сульфанілової, сірчанної, дубильної, винної, толуолсульфонової, та широко поширених амінокислот, наприклад, гліцину, аланіну, фенілаланіну, аргініну і т.д.

Інші приклади фармацевтично прийнятних солей включають гексанову кислоту, циклопентанпропіонову кислоту, піровиноградну кислоту, малонову кислоту, 3-(4-гідроксибензоїл)бензойну кислоту, коричну кислоту, 4-хлорбензолсульфову кислоту, 2-нафталінсульфову кислоту, 4-толуолсульфову кислоту, камфорсульфову кислоту, 4-метилбіцикло[2.2.2]окт-2-ен-1-карбоніву кислоту, 3-фенілпропіонову кислоту, триметилоцтову кислоту, трет-бутилоцтову кислоту, муонову кислоту тощо. Даний винахід також включає солі, що утворюються при заміщенні присутнього у вихідній сполуці кислого протону іоном металу, наприклад, іоном лужного металу, іоном лужноземельного металу або іоном алюмінію; або координуванні з органічною основою, такою як етаноламін, діетаноламін, триетаноламін, трометамін, N-метилглюкамін тощо. Очевидно, що у формі солі відношення сполуки до катіону або аніону солі може складати 1:1, або будь-яке інше відношення, відмінне від 1:1, наприклад, 3:1, 2:1, 1:2 або 1:3.

Слід розуміти, що усі посилання на фармацевтично прийнятні солі включають форми приєднання розчинника (сольвати) або кристалічні форми (поліморфи) цієї солі, визначені в даному описі.

Сполуки або їх фармацевтично прийнятні солі вводять перорально, назально, трансдермально, через легені, шляхом інгаляції, трансбукально, сублінгвально, інтраперитонеально, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, ректально, внутрішньоплеврально, інтратекально та парентерально. В одному з варіантів реалізації сполуку вводять перорально. Для фахівця в даній галузі техніки очевидні переваги конкретних шляхів введення.

Режим дозування із застосуванням сполук вибирають згідно з різними факторами, включаючи тип, вид, вік, масу тіла, стать та стан пацієнта; тяжкість стану, який лікують; шлях введення; функцію нирок та печінки пацієнта; та конкретну використовувану сполуку або її сіль. Кваліфікований лікар або ветеринар може легко визначити та призначити ефективну кількість лікарського засобу, необхідну для запобігання, протидії або зупинення прогресування стану.

Способи включення до складу композицій та введення описаних сполук згідно з даним винаходом можна знайти в *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). В одному з варіантів реалізації сполуки, описані в даному документі, та їх фармацевтично прийнятні солі застосовують в фармацевтичних препаратах в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем. Придатні фармацевтично прийнятні носії включають тверді інертні наповнювачі або розріджувачі та стерильні водні або органічні розчини. Сполуки будуть присутніми в таких фармацевтичних композиціях в кількостях, достатніх для забезпечення бажаної величини дози в діапазоні, наведеному в даному описі.

Усі проценти та співвідношення, використовувані в даному описі, якщо не вказане інше, наведені по масі. Інші ознаки та переваги даного винаходу очевидні з різних прикладів. Наведені приклади ілюструють різні компоненти та методику, придатну для практичного застосування даного винаходу. Вказані приклади не обмежують заявлений винахід. Виходячи з даного опису, фахівець в даній галузі техніки може визначити та використовувати інші компоненти та методику, придатну для практичного застосування даного винаходу.

На схемах синтезу та в хімічних структурах, описаних в даному документі, сполуки для

простоти можуть бути зображені в одній конкретній конфігурації (наприклад, з або без конкретного вказаного стереоізомера). Такі конкретні конфігурації або їх відсутність не обмежують даний винахід тим чи іншим ізомером, таутомером, регіоізомером або стереоізомером, а також не виключають суміші ізомерів, таутомерів, регіоізомерів або стереоізомерів; однак очевидно, що конкретний ізомер, таутомер, регіоізомер або стереоізомер може мати більш високий рівень активності, ніж інший ізомер, таутомер, регіоізомер або стереоізомер.

Сполуки, розроблені, вибрані та/або оптимізовані способами, описаними вище, після одержання можуть бути охарактеризовані з використанням різних аналізів, відомих фахівцю в даній галузі техніки, для визначення, чи виявляють вказані сполуки біологічну активність. Наприклад, молекули можуть бути охарактеризовані за допомогою звичайних аналізів, включаючи, без обмеження ними, аналізи, описані нижче, для визначення, чи виявляють вони очікувану активність, активність зв'язування та/або специфічність зв'язування.

Крім того, може бути використаний високопродуктивний скринінг для прискорення аналізу з використанням таких методів аналізу. Завдяки цьому, стає можливим швидкий скринінг молекул, описаних в даному документі, на предмет активності з використанням методів, відомих в даній галузі техніки. Загальні методики проведення високопродуктивного скринінгу описані, наприклад, в Devlin (1998) *High Throughput Screening*, Marcel Dekker; та в патенті США №5763263. В високопродуктивних аналізах можна використовувати один чи декілька різних методів аналізу, включаючи, без обмеження ними, ті, що описані нижче.

Зміст усіх публікацій та патентних документів, наведених в даному описі, включений в даний опис шляхом посилання так само, як би зміст кожної такої публікації або документа був спеціально включений в даний опис окремо. Посилання на публікації та патентні документи не є визнанням того, що будь-який з вказаних документів стосується відповідного рівня техніки, а також не є визнанням цього по відношенню до змісту чи дати. Після опису даного винаходу в письмовій формі, для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що даний винахід можна практично застосовувати в різних варіантах, та що вищенаведений опис та приклади нижче наведені в цілях ілюстрації та не обмежують формулу винаходу, що йде далі.

Приклади

Приклад 1. Синтези сполук згідно з даним винаходом

Загальні експерименти

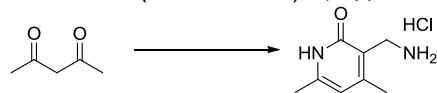
ЯМР

¹H-ЯМР-спектри одержували з використанням CDCl₃, якщо не вказано інше, та реєстрували на 400 або 500 МГц з використанням магнітних інструментів (500 МГц) Varian або Oxford instruments. Вказана мультиплетність позначає: s = синглет, d = дублет, t = триплет, q = квартет, quint = квінтет, sxt = секстет, m = мультиплет, dd = дублет дублетів, dt = дублет триплетів; br означає широкий сигнал.

PX-MC та BEPX

Маса: недефективна PX Waters Acquity. BEPX: Продукти аналізували за допомогою Shimadzu SPD-20A з колонкою YMC ODS-M80 150 × 4,5 мм або колонкою YMC-Pack Pro C18 150 × 4,6 мм при 1,0 мл/хв. Рухома фаза була сумішшю MeCN:H₂O=3:2 (що містить 0,3% SDS та 0,05% H₃PO₄). Продукти очищали шляхом BEPX/MC (MeOH-H₂O, що містить 0,1 % гідроксид амонію) з використанням Waters AutoPurification System з мас-детектором 3100.

HCl сіль 3-(амінометил)-4,6-диметил-1,2-дигідропіридин-2-ону



До розчину 2-ціаноацетаміду (8,40 г, 100 ммоль) та ацетилацетону (10,0 г, 100 ммоль) в H₂O (200 мл) додавали K₂CO₃ (4,00 г, 28,9 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 22 годин. Потім тверду речовину, що випала до осаду, фільтрували з використанням лійки Бюхнера, промивали льодяною H₂O та сушили під вакуумметричним тиском з одержанням 4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилу (13,5 г, вихід 91%).

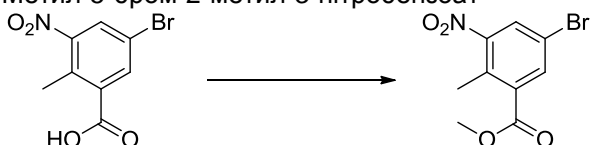
До розчину 4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилу (10,0 г, 67,5 ммоль) в MeOH (1,50 л) та конц. HCl (30 мл) додавали 10% Pd(OH)₂ (19 г) в атмосфері N₂. Газоподібний N₂ витісняли газоподібним H₂, і суміш перемішували протягом 26 годин при кімнатній температурі в атмосфері водню. Газоподібний H₂ витісняли газоподібним N₂. Суміш фільтрували через целіт, промивали MeOH та концентрували. Залишок розтирали з EtOH, збирали за допомогою лійки Бюхнера та сушили під вакуумметричним тиском з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді білої твердої речовини (11,5 г, 90%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ ppm 11,86 (brs, 1H), 5,98 (s, 1H), 3,78 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 2,16 (s, 3H).

5-Бром-2-метил-3-нітробензойна кислота



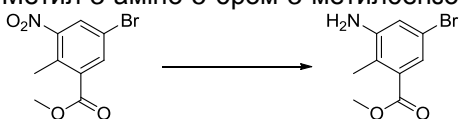
До перемішаного розчину 2-метил-3-нітробензойної кислоти (5,00 г, 27,6 ммоль) в H_2SO_4 (20 мл) додавали 1,3-дибром-5,5-диметилгідантоїн (4,34 г, 15,20 ммоль) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 5 годин. Реакційну суміш вливали в льодяну воду, одержану тверду речовину, що випала до осаду, збирали, промивали водою та сушили в вакуумі з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді білої твердої речовини (7,28 г, кількісний вихід). ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm; 8,31 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 2,43 (s, 3H).

Метил-5-бром-2-метил-3-нітробензоат



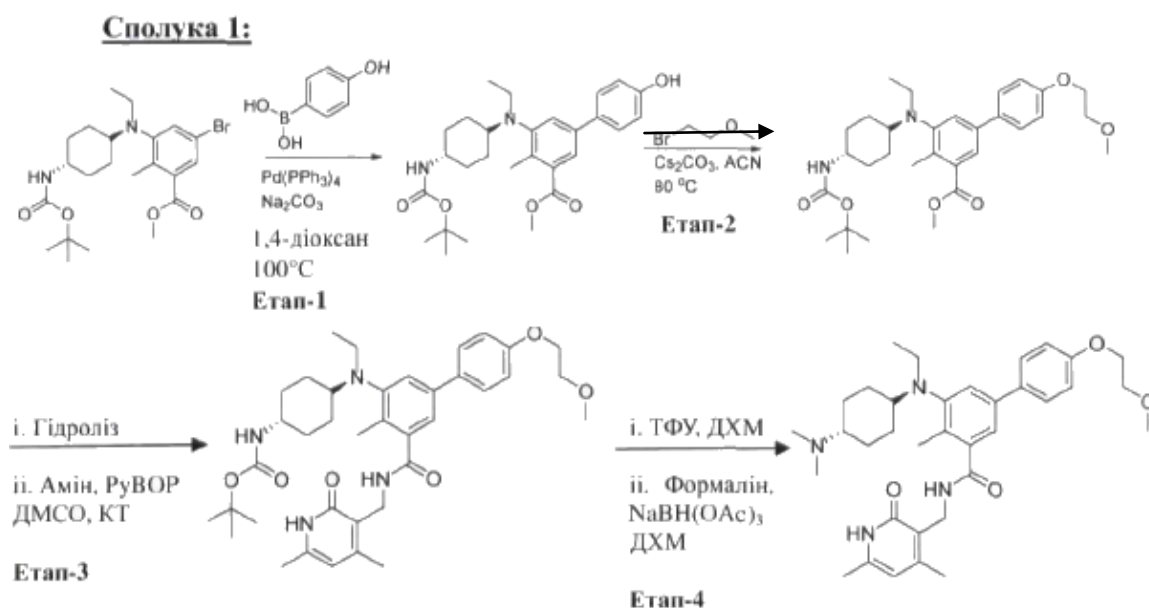
До перемішаного розчину 5-бром-2-метил-3-нітробензойної кислоти (7,28 г, 28,0 ммоль) в ДМФА (100 мл) додавали натрію карбонат (11,9 г, 112 ммоль) та метилйодид (15,9 г, 112 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 60 °С протягом 8 годин. Після завершення реакції реакційну суміш фільтрували та промивали етилацетатом. Об'єднаний фільтрат промивали водою і водну фазу повторно екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні фази сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували та концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді твердої речовини. (7,74 г, кількісний вихід). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ ppm; 8,17 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 2,59 (s, 3H).

Метил-3-аміно-5-бром-3-метилбензоат



До перемішаного розчину метил-5-бром-2-метил-3-нітробензоату (7,60 г, 27,7 ммоль) в водн. EtOH (100 мл EtOH та 20 мл H_2O) додавали амонію хлорид (4,45 г, 83,1 ммоль) та залізо (4,64 г, 83,1 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 80 °С протягом 5 годин. Потім суміш фільтрували через целіт і шар целіту промивали етилацетатом. Об'єднаний фільтрат концентрували в вакуумі. Одержаний залишок розчиняли в етилацетаті та воді. Водну фазу екстрагували етилацетатом (два рази). Об'єднану органічну фазу сушили над безводним сульфатом натрію, фільтрували та концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді масла коричневого кольору (6,67 г, 99%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ ppm; 7,37 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,80 (brs, 2H), 2,31 (s, 3H).

Сполука 1:



1 етап: Синтез метил-5-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-4'-гідрокси-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксилату

До перемішаного розчину метил-5-бром-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату (10 г, 21,3 ммоль, див., наприклад, WO2012142504 (номер патентного реєстру 41478-507001WO)) та (4-гідроксифеніл)боронової кислоти (3,5 г, 25,3 ммоль) в суміші діоксану (225 мл) та води (75 мл) додавали Na_2CO_3 (8,01 г, 75,5 ммоль), і розчин продували аргоном протягом 30 хвилин. Потім додавали $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2,4 г, 2,07 ммоль) та знова продували аргоном протягом ще 15 хвилин. Реакційну масу нагрівали при 100 °C протягом 4 годин. Після завершення реакційну суміш розбавляли водою та екстрагували етилацетатом. Об'єднану органічну фазу сушили над сульфатом натрію. В результаті видалення розчинника при зниженому тиску з подальшою очисткою шляхом колонкової хроматографії одержували сполуку, вказану в заголовку (8,9 г, вихід 87%).

2 етап: Синтез метил-5-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-4'-(2-метоксіетокси)-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксилату

До перемішаного розчину метил-5-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-4'-гідрокси-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксилату (0,6 г, 1,24 ммоль) та 1-бром-2-метоксіетану (0,519 г, 3,73 ммоль) в ацетонітрилі (6 мл) додавали Cs_2CO_3 (0,485 г, 1,49 ммоль), та реакційну суміш перемішували при 80 °C протягом 12 годин. Після завершення до неї додавали воду та екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні фази сушили над безводним сульфатом натрію та концентрували при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (0,6 г, вихід 76,5%).

3 етап: Синтез трет-бутил-((транс)-4-((5-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)-метил)карбамоїл)-4'-(2-метоксіетокси)-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-іл- (етил)аміно)циклогексил)карбамату

Водний NaOH (0,066 г, 1,66 ммоль в 5 мл H_2O) додавали до розчину метил-5-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-4'-(2-метоксіетокси)-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксилату (0,6 г, 1,11 ммоль) в EtOH (10 мл) та перемішували при 60 °C протягом 1 години. Після завершення реакції видаляли етанол при зниженому тиску та залишок підкислювали з використанням лимонної кислоти та доводили до pH 4 з використанням лимонної кислоти. Здійснювали екстракцію з використанням 10% метанолу в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили, концентрували з одержанням відповідної кислоти (0,5 г, вихід 85,6%).

Потім вищевказану кислоту (0,5 г, 0,95 ммоль) розчиняли в ДМСО (5 мл) та до неї додавали 3-(амінометил)-4,6-диметилпіридин-2(1H)-он (0,288 г, 1,90 ммоль) та триетиламін (0,096 г, 0,950 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин перед додаванням до неї РуВор (0,741 г, 1,42 ммоль) та продовжували перемішувати протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції реакційну масу виливали на лід та

здійснювали екстракцію з використанням 10% MeOH/ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над сульфатом натрію та концентрували при зниженому тиску з одержанням неочищеної речовини, яку потім очищали шляхом колонкової хроматографії з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (0,45 г, вихід 71,8%).

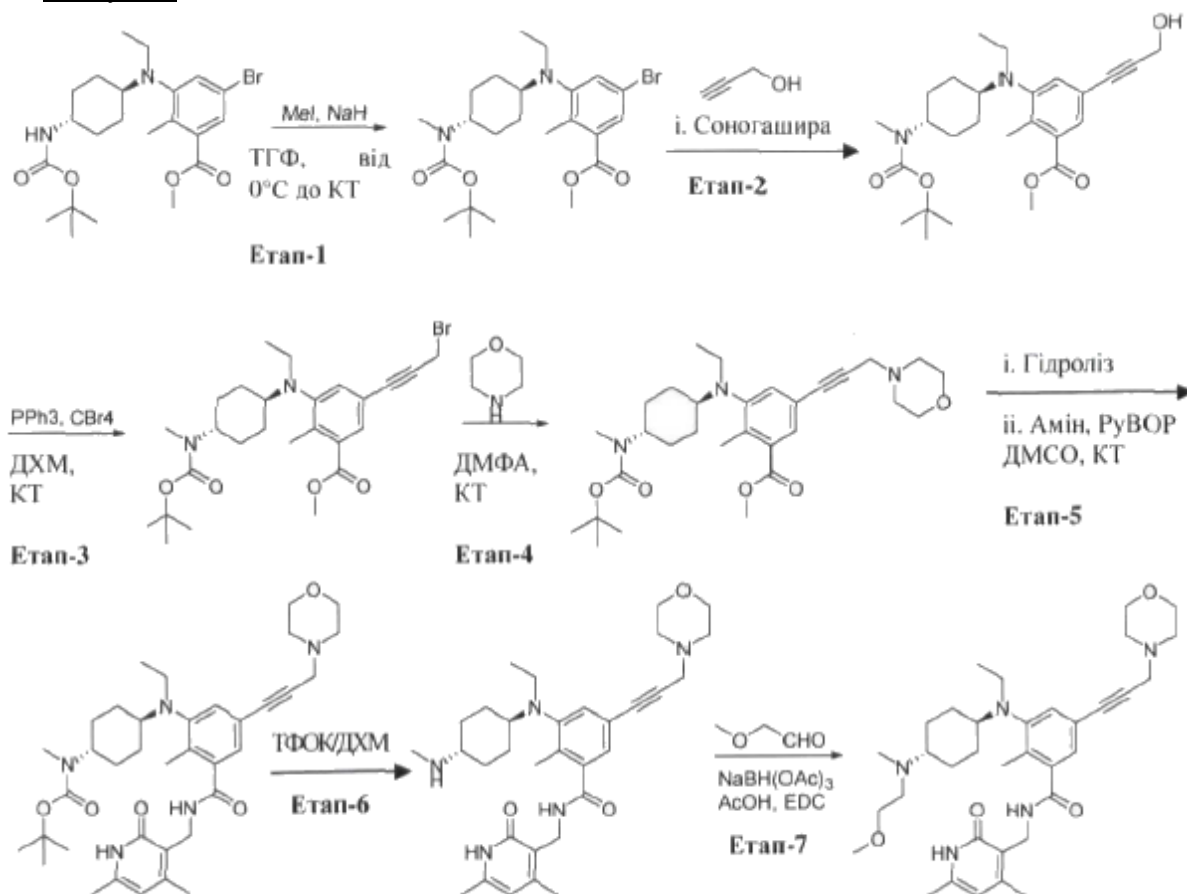
4 етап: Синтез N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-5-(((транс)-4-(диметиламіно)циклогексил)(етил)аміно)-4'-(2-метоксіетокси)-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксаміду

До перемішаного розчину трет-бутил-((транс)-4-(((5-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамоїл)-4'-(2-метоксіетокси)-4-метил-[1,1'-біфеніл]-3-іл(етил)-аміно)циклогексил)карбамату (0,45 г, 0,681 ммоль) в ДХМ (5 мл) при 0 °С додавали ТФОК (1 мл) та реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після завершення реакційну суміш концентрували досуха. Потім залишок підлугувували Na₂CO₃ (водн.) до pH 8 та водну фазу екстрагували 20% метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над Na₂SO₄ та розчинник видаляли при зниженому тиску з одержанням Вос-незахищеної сполуки (0,3 г, вихід 78,7%).

До перемішаного розчину Вос-незахищеної сполуки (0,3 г, 0,535 ммоль) в дихлорметані (3 мл) додавали розчин формальдегіду (35-41% водн.) (0,056 г, 1,87 ммоль) при 0 °С та перемішували протягом 20 хвилин. Потім додавали NaBH(OAc)₃ (0,28 г, 1,33 ммоль) та перемішували протягом 2 годин при 0 °С. Після завершення реакції додавали воду та екстрагували 20% метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над Na₂SO₄ та видаляли розчинник при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом преп. ВЕРХ з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (0,1 г, вихід 31,7%).

РХ-МС: 589,75 (M+1)⁺; ТФОК-сінь: ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц) δ 11,47 (brs, 1H), 9,48 (brs, 1H), 8,21 (brs, 1H), 7,57 (d, 2H, J=8,0 Гц), 7,40 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,03 (d, 2H, J=8,8 Гц), 5,87 (s, 1H), 4,29 (d, 2H, J=4,4 Гц), 4,14-4,12 (m, 2H), 3,69-3,66 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 3,13 (m, 4H), 2,69-2,68 (m, 6H), 2,24 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 1,96 (m, 4H), 1,44 (m, 4H), 0,85 (t, 3H, J=6,8 Гц).

Сполука 2:



1 етап: Синтез метил-5-бром-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)-циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату

До перемішаного розчину метил-5-бром-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату (3 г, 6,41 ммоль, див., наприклад, WO2012142504) в ТГФ (30 мл) додавали NaH (0,184 г, 7,69 ммоль) при 0 °С та перемішували при цій самій температурі протягом 20 хвилин. Потім додавали метилйодид (9,10 г, 64,10 ммоль) при 0 °С та реакційну суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакційну суміш гасили льодяною водою та екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні фази промивали водою, сушили, концентрували при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії з одержанням неочищеної сполуки, вказаної в заголовку, яку використовували без додаткової очистки (3 г, вихід 97,4%).

2 етап: Синтез метил-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)-циклогексил)(етил)аміно)-5-(3-гідроксипроп-1-ін-1-іл)-2-метилбензоату

До перемішаного розчину метил-5-бром-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату (2 г, 4,14 ммоль) в сухому толуолі додавали CuI (0,015 г, 0,079 ммоль), PPh₃ (0,043 г, 0,165 ммоль), PdCl₂(PPh₃)₂ (0,058 г, 0,082 ммоль), N,N-діізопропіламін (1,08 г, 10,78 ммоль) та реакційну суміш продували аргонном протягом 15 хвилин. До неї додавали проп-2-ін-1-ол (0,46 г, 8,29 ммоль), реакційну суміш нагрівали при 80 °С в герметичних умовах протягом 5 годин. Після завершення її гасили водою та екстрагували етилацетатом. Органічну фазу сушили над Na₂SO₄. Неочищену сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (1,2 г, вихід 63,2%).

3 етап: Синтез метил-5-(3-бромпроп-1-ін-1-іл)-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату:

До перемішаного розчину метил-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-5-(3-гідроксипроп-1-ін-1-іл)-2-метилбензоату (1,2 г, 2,62 ммоль) в ДХМ (15 мл) додавали PPh₃ (1,37 г, 5,22 ммоль) та CBr₄ (1,7 г, 5,10 ммоль) при 0 °С, та реакційну суміш перемішували протягом 4 годин при кімнатній температурі. Після завершення реакцію гасили льодяною водою та екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні фази промивали водою, сушили, концентрували при зниженому тиску. Неочищену речовину очищали шляхом колонкової хроматографії з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (0,5 г, вихід 38,5%).

4 етап: Синтез метил-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензоату

До перемішаного розчину метил-5-(3-бромпроп-1-ін-1-іл)-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату (1 екв.) в ДМФА додавали морфолін (5 екв.) та реакційну суміш перемішували протягом 12 годин при кімнатній температурі. Після завершення реакцію гасили льодяною водою та екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні фази промивали водою, сушили, концентрували при зниженому тиску з одержанням бажаної неочищеної сполуки, вказаної в заголовку, яку використовували на наступному етапі без додаткової очистки (вихід 98,7%)

5 етап: Синтез трет-бутил-((транс)-4-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамоїл)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)феніл)(етил)-аміно)циклогексил)(метил)карбамату

NaOH (1,5 екв.) додавали до розчину метил-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензоату (1 екв.) в EtOH:H₂O (9:1) та перемішували при 60 °С протягом 1 години. Після завершення реакції видаляли етанол при зниженому тиску та підкислювали з використанням розбавленої HCl до pH 6, та доводили до pH 4 з використанням лимонної кислоти. Здійснювали екстракцію з використанням 10% метанолу в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили, концентрували з одержанням відповідної кислоти.

Потім вищевказану кислоту (1 екв.) розчиняли в ДМСО та до неї додавали 3-(амінометил)-4,6-диметилпіридин-2(1H)-он (2 екв.) та триетиламін (1 екв.). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин перед додаванням до неї RuVор (1,5 екв.) та продовжували перемішувати протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції реакційну масу виливали на лід та здійснювали екстракцію з використанням 10% MeOH/ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над Na₂SO₄ та концентрували при зниженому тиску з одержанням неочищеної речовини, яку потім очищали спочатку водою, а потім промивали ацетонітрилом з одержанням бажаної сполуки, вказаної в заголовку (вихід 69,4%).

6 етап: Синтез N-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил((транс)-4-(метиламіно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензаміду

До перемішаного розчину трет-бутил-((транс)-4-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-

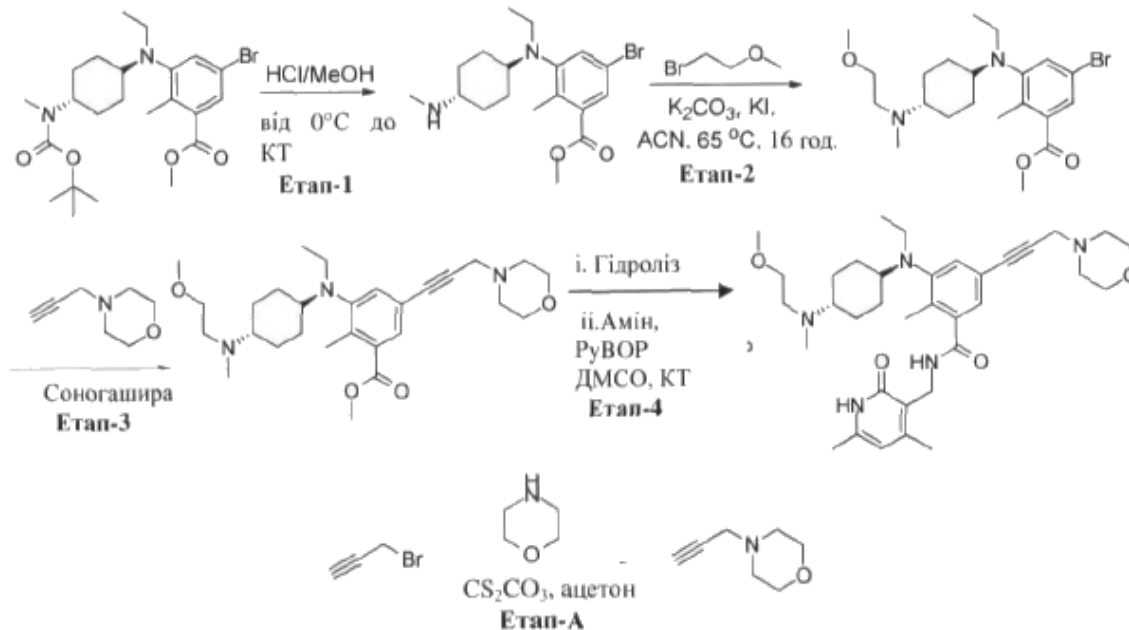
дигідропіридин-3-іл)метил)карбамоїл)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)феніл)(етил)-аміно)циклогексил)(метил)карбамату (1 екв.) в ДХМ при 0 °С додавали ТФОК (3 екв.) та реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після завершення реакційну суміш концентрували досуха. Потім залишок підлгоували Na_2CO_3 (водн.) до pH 8 та водну фазу екстрагували 20% метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над Na_2SO_4 та розчинник видаляли при зниженому тиску з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (вихід 99%), яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки.

7 етап: Синтез N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензаміду

До перемішаного розчину N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил((транс)-4-(метиламіно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензаміду (1 екв.) в дихлоретані додавали 2-метоксіацетальдегід (10 екв.) та оцтову кислоту (6 екв.) при 0 °С, та перемішували протягом 20 хвилин. Потім додавали $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3 екв.) та перемішували протягом 2 годин при 0 °С. Після завершення реакції додавали воду та екстрагували 20% метанолом в ДХМ. Об'єднані органічні фази сушили над Na_2SO_4 та видаляли розчинник при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом преп. ВЕРХ з одержанням цільової молекули (0,1 г, вихід 33,6%).

РХ-МС: 606,65 ($\text{M}+1$)⁺; ТФОК-сіль: ¹Н ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 400 МГц) δ 11,50 (brs, 1H), 9,22 (brs, 1H), 8,18 (t, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 5,86 (s, 1H), 4,26-4,25 (m, 4H), 3,66-3,59 (m, 4H), 3,48-3,36 (m, 3H), 3,29-3,17 (m, 7H), 3,04-3,01 (m, 3H), 2,69-2,68 (m, 4H), 2,20 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,00-1,92 (m, 2H), 1,82-1,73 (m, 3H), 1,46 (m, 4H), 0,78 (t, 3H, $J=6,4$ Гц).

Альтернативна схема синтезу сполуки 2:



Етап А: Синтез 4-(проп-2-ін-1-іл)морфоліну:

До перемішаного розчину пропаргилброміду (50 г, 420 ммоль) в ацетоні (300 мл) додавали Cs_2CO_3 (136,5 г, 420 ммоль) при 0 °С. Потім по краплинах додавали морфолін (36,60 г, 420 ммоль) в ацетоні (200 мл) та реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин. Після завершення фільтрували реакційну масу, і фільтрат концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (50 г, неочищена). Виділену сполуку використовували безпосередньо на наступному етапі сполучення без додаткової очистки.

1 етап: Синтез метил-5-бром-3-(етил((транс)-4-(метиламіно)циклогексил)аміно)-2-метилбензоату:

До перемішаного розчину метил-5-бром-3-(((транс)-4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)циклогексил)(етил)аміно)-2-метилбензоату (30 г, 62,24 ммоль) в метанолі (100 мл) при 0 °С додавали розчин HCl в метанолі (500 мл) та реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після завершення реакційну суміш концентрували досуха. Залишок підлгоували Na_2CO_3 (водн.) до pH 8 та водну фазу екстрагували 10% метанолом в ДХМ (200 мл \times 3). Об'єднані органічні фази сушили над Na_2SO_4 та видаляли розчинник при зниженому тиску з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді безбарвного масла (25 г,

неочищене). Виділену сполуку використовували на наступному етапі без додаткової очистки.

2 етап: Синтез метил-5-бром-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)-циклогексил)аміно)-2-метилбензоату:

До перемішаного розчину неочищеного метил-5-бром-3-(етил((транс)-4-(метиламіно)-циклогексил)аміно)-2-метилбензоату (25 г, 65,44 ммоль), 1-бром-2-метоксіетану (18,19 г, 130,8 ммоль) в ацетонітрилі (250 мл) додавали K_2CO_3 (18,06 г, 130,8 ммоль) та KI (6,51 г, 39,21 ммоль). Одержану реакційну масу перемішували при 65 °C протягом 16 годин. Після завершення реакційну суміш разбавляли водою (300 мл) та екстрагували ДХМ (500 мл × 3). Об'єднані органічні фази промивали водою, сушили над Na_2SO_4 та концентрували при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (20 г, вихід 69,3%).

1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц) δ 7,55 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,32 (m, 4H), 3,20 (s, 3H), 3,05 (q, 2H), 2,61 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,30 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 1,77-1,67 (m, 4H), 1,37-1,31 (m, 2H), 1,24-1,18 (m, 2H), 0,78 (t, 3H, $J=6,8$ Гц).

3 етап: Синтез метил-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензоату:

Розчин метил-5-бром-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)циклогексил)аміно)-2-метилбензоату (30 г, 68,02 ммоль), 4-(проп-2-ін-1-іл)морфоліну (25,51 г, 204 ммоль) та триетиламіну (20,61 г, 204 ммоль) в ДМФА (300 мл) барботували аргоном протягом 20 хвилин. Потім додавали CuI (3,87 г, 20,36 ммоль) та Pd (PPh_3) $_4$ (7,85 г, 6,79 ммоль), та барботували аргоном протягом ще 20 хвилин. Реакційну суміш нагрівали при 105 °C протягом 4 годин, а потім охолоджували до кімнатної температури. Реакцію гасили водою (100 мл) та водну фазу екстрагували 10% MeOH/ДХМ (400 мл × 3). Об'єднані органічні екстракти сушили над Na_2SO_4 , фільтрували та концентрували. Залишок очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (21 г, вихід 63,7%).

1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц) δ 7,46 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,62-3,57 (m, 6H), 3,50 (s, 2H), 3,35-3,32 (m, 2H), 3,21 (s, 3H), 3,17 (m, 1H), 3,05 (q, 2H), 2,61-2,58 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,33 (m, 1H), 2,18 (m, 2H), 1,77-1,70 (m, 4H), 1,36-1,20 (m, 4H), 0,77 (t, 3H, $J=6,8$ Гц), 3H злився з піком розчинника.

4 етап: Синтез N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензаміду:

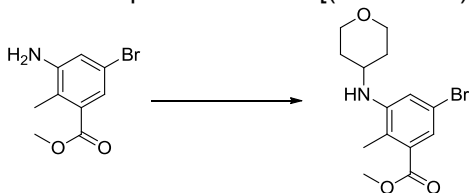
Водний NaOH (2,59 г, 64,91 ммоль в 10 мл H_2O) додавали до розчину метил-3-(етил((транс)-4-((2-метоксіетил)(метил)аміно)циклогексил)аміно)-2-метил-5-(3-морфолінопроп-1-ін-1-іл)бензоату (21 г, 43,29 ммоль) в EtOH (100 мл) та перемішували при 60 °C протягом 1 години. Після завершення реакції видаляли етанол при зниженому тиску, і залишок підкислювали з використанням розбавленої HCl до pH 4 з використанням лимонної кислоти. Здійснювали екстракцію з використанням 10% MeOH/ДХМ (200 мл × 3). Об'єднані органічні фази сушили, концентрували з одержанням відповідної кислоти (15,5 г, вихід 76%).

До розчину вищевказаної кислоти (15,5 г, 32,90 ммоль) в ДМСО (50 мл) додавали 3-(амінометил)-4,6-диметилпіридин-2(1H)-он (10 г, 65,80 ммоль) та триетиламін (23 мл, 164,5 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин перед додаванням до неї RuVор (25,66 г, 49,34 ммоль) при 0 °C та додатково перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакційну масу вливали в льодяну воду (100 мл) та здійснювали екстракцію з використанням 10% MeOH/ДХМ (200 мл × 3). Об'єднані органічні фази сушили над Na_2SO_4 та концентрували при зниженому тиску. Неочищену сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії на лужному оксиді алюмінію, елюючи MeOH:ДХМ, з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (11 г, вихід 55,3%).

РХ-МС: 606,50 ($M + 1$) $^+$; 1H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 7,23 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,74-3,72 (m, 4H), 3,51 (s, 2H), 3,47 (t, 2H, $J=5,6$ Гц), 3,32 (s, 3H), 3,07 (q, 2H, $J=7,2$ Гц), 2,64-2,63 (m, 7H), 2,38 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,89-1,86 (m, 4H), 1,50-1,30 (m, 4H), 0,83 (t, 3H, $J=7,2$ Гц).

Сполука 105:

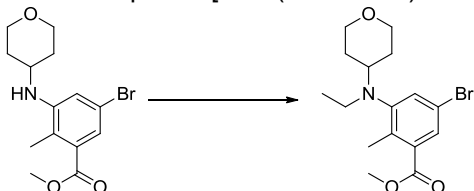
Метил-5-бром-2-метил-3-[(оксан-4-іл)аміно]бензоат



До перемішаного розчину метил-3-аміно-5-бром-2-метилбензоату (40,2 г, 165 ммоль) в

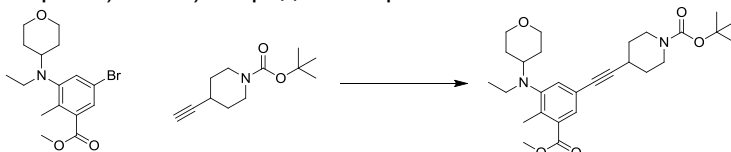
CH₂Cl₂ (500 мл) та AcOH (60 мл) додавали дигідро-2H-піран-4-он (17,3 г, 173 ммоль) та триацетоксиборгідрид натрію (73,6 г, 330 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 20 годин. Потім додавали насичений водний розчин NaHCO₃ та суміш розділяли. Водну фазу екстрагували CH₂Cl₂ та об'єднану органічну фазу концентрували в вакуумі. Залишок розтирали з етиловим ефіром та збирали одержаний осад з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді білої твердої речовини (39,1 г, 72%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ ppm; 7,01 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 5,00 (d, J = 7,6 Гц, 1H), 3,84-3,87 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,54-3,56 (m, 1H), 3,43 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,81-1,84 (m, 2H), 1,47-1,55 (m, 2H).

Метил-5-бром-3-[етил(оксан-4-іл)аміно]-2-метилбензоат



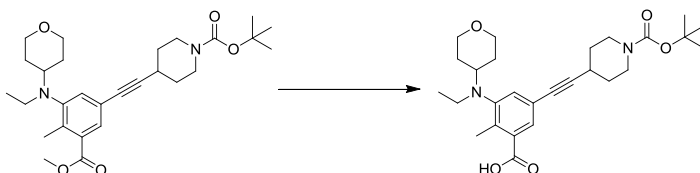
До перемішаного розчину метил-5-бром-2-метил-3-[(оксан-4-іл)аміно]бензоату (39,1 г, 119 ммоль) в CH₂Cl₂ (400 мл) та AcOH (40 мл) додавали ацетальдегід (24,7 г, 476 ммоль) та триацетоксиборгідрид натрію (79,6 г, 357 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Потім додавали насичений водний розчин NaHCO₃ та суміш розділяли. Водну фазу екстрагували CH₂Cl₂ та об'єднану органічну фазу концентрували в вакуумі. Залишок очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі (SiO₂ гептан/EtOAc = 3/1) з одержанням сполуки, вказаної в заголовку, у вигляді в'язкого масла (44,1 г, кількісний вихід). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ ppm; 7,62 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 3,80 (m, 5H), 3,31 (m, 2H), 2,97-3,05 (m, 2H), 2,87-2,96 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 1,52-1,61 (m, 2H), 1,37-1,50 (m, 2H), 0,87 (t, J = 6,8 Гц, 3H).

Трет-бутил-4-((3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-5-(метоксикарбоніл)-4-метилфеніл)етиніл)піперидин-1-карбоксилат



До розчину метил-5-бром-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метилбензоату (1,80 г, 5,05 ммоль) та трет-бутил-4-етинілпіперидин-1-карбоксилату (1,80 г, 8,59 ммоль) в ДМФА (40 мл) додавали триетиламін (2,82 мл, 20,2 ммоль) та йодид міді(I) (0,096 г, 0,505 ммоль). Реакційну суміш дегазували шляхом барботування азотом протягом 15 хвилин. Потім вводили тетракіс(трифенілфосфін)паладій(0) (0,292 г, 0,253 ммоль) та дегазували протягом ще 10 хвилин шляхом барботування азотом. Реакційну суміш нагрівали при 80 °C протягом 6 годин. Реакцію гасили насиченим розчином NaHCO₃, екстрагували МТБЕ (3×40 мл), сушили над Na₂SO₄, фільтрували та концентрували. Залишок очищали шляхом хроматографії (0%-40% AcOEt/гептан) з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (2,40 г, вихід 98%). ¹H-ЯМР (500 МГц) δ ppm; 7,65 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 3,97 (brd, J = 11,3 Гц, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,76 (m, 2H), 3,34 (dt, J = 2,0, 11,7 Гц, 2H), 3,24 (ddd, J = 3,4, 8,8, 12,2 Гц, 2H), 3,08 (brs, 2H), 2,98 (brs, 1H), 2,80 (dddd, J = 3,9, 3,9, 3,9, 3,9 Гц, 1H), 2,52 (s, 3H), 1,87 (m, 2H), 1,60-1,74 (m, 6H), 1,48 (s, 9H), 0,89 (t, J = 6,8 Гц, 3H); МС (ESI) [M+H]⁺ 485,4.

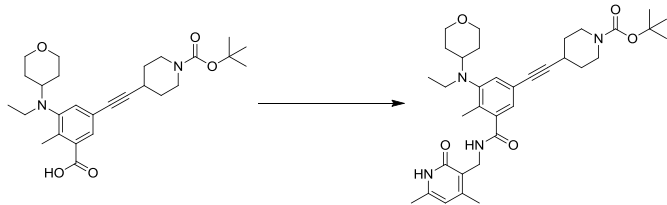
5-((1-(Трет-бутоксикарбоніл)піперидин-4-іл)етиніл)-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метилбензойна кислота



До розчину трет-бутил-4-((3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-5-(метоксикарбоніл)-4-метилфеніл)етиніл)піперидин-1-карбоксилату (2,4 г, 4,95 ммоль) в етанолі (20,0 мл) додавали розчин гідроксиду натрію (0,565 г, 14,1 ммоль) у воді (3,0 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Реакційну суміш гасили 1 М HCl (5 мл), а потім надлишком розчину лимонної кислоти з доведенням рН до 5. Суміш концентрували з видаленням EtOH і водну фазу, що залишилася, екстрагували AcOEt (2×40 мл). Органічні фази об'єднували, сушили над Na₂SO₄, фільтрували та концентрували. Залишок очищали шляхом

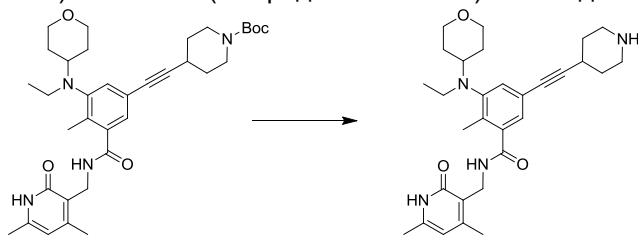
хроматографії (10%-100% AcOEt/гептан) з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (2,30 г, вихід 99%). ^1H -ЯМР (500 МГц) δ ppm; 7,82 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 3,98 (brd, J = 11,3 Гц, 2H), 3,77 (m, 2H), 3,35 (dt, J = 1,5, 11,3 Гц, 2H), 3,25 (ddd, J = 3,4, 8,3, 12,2 Гц, 2H), 3,11 (brs, 2H), 3,00 (brs, 1H), 2,81 (dddd, J = 3,9, 3,9, 3,9, 3,9 Гц, 1H), 2,60 (s, 3H), 1,88 (m, 2H), 1,60-1,78 (m, 6H), 1,48 (s, 9H), 0,90 (t, J = 6,8 Гц, 3H); МС (ESI) $[M+H]^+$ 471,4.

Трет-бутил-4-((3-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамоїл)-5-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-4-метилфеніл)етиніл)піперидин-1-карбоксилат



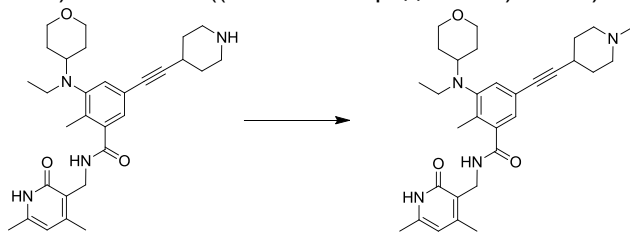
До розчину 5-((1-(трет-бутоксикарбоніл)піперидин-4-іл)етиніл)-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метилбензойної кислоти (1,06 г, 2,25 ммоль) в ДМСО (5,8 мл) при кімнатній температурі додавали триетиламін (0,90 мл, 6,44 ммоль) та (4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метанамінію хлорид (0,405 г, 2,15 ммоль). Прозорий розчин робився гетерогенним. Потім додавали НОВТ (0,493 г, 3,22 ммоль) та EDC (0,617 г, 3,22 ммоль), і одержану реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Реакцію гасили водою (80 мл) та суспензію перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Фільтрували суспензію та осад на фільтрі промивали водою (2×20 мл). Сушили зібрану тверду речовину під вакуумом з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (1,27 г, вихід 98%). ^1H -ЯМР (500 МГц, CD_3OD) δ ppm; 7,22 (s, 1H), 7,08 (d, J = 1,0 Гц, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,92 (brd, J = 10,8 Гц, 2H), 3,78 (dd, J = 4,4, 5,4 Гц, 1H), 3,75 (dd, J = 4,4, 5,4 Гц, 1H), 3,36 (t, J = 11,7 Гц, 2H), 3,21 (br t, J = 8,3 Гц, 2H), 3,07 (q, J = 7,3 Гц, 2H), 3,01 (dddd, J = 3,9, 3,9, 11,3, 11,3 Гц, 1H), 2,84 (dddd, J = 3,4, 3,4, 3,9, 3,9 Гц, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,88 (m, 2H), 1,70 (brd, J = 12,2 Гц, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 0,87 (t, J = 7,3 Гц, 3H); МС (ESI) $[M+H]^+$ 605,6.

N-((4,6-Диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метил-5-(піперидин-4-ілетиніл)бензамід



До розчину трет-бутил-4-((3-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамоїл)-5-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-4-метилфеніл)етиніл)піперидин-1-карбоксилату (250 мг, 0,413 ммоль) в ДХМ (3 мл) додавали 4 М HCl в 1,4-діоксані (3 мл, 12,0 ммоль) при 20 °С. Суміш перемішували при 20 °С протягом 1 години. РХ-МС показувала завершення реакції. Реакційну суміш напругу концентрували та залишок розчиняли в ДХМ, а потім нейтралізували насич. NaHCO_3 /сольовим розчином. Органічну фазу сушили (Na_2SO_4) та фільтрували. і фільтрат концентрували. Залишок використовували для алкілювання без додаткової очистки (209 мг, 100%). ^1H -ЯМР (500 МГц, CD_3OD) δ ppm 7,21 (brs, 1H), 7,07 (brs, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,95-3,89 (m, 2H), 3,39-3,34 (m, 2H), 3,08 (q, J = 7,0 Гц, 2H), 3,06-2,98 (m, 3H), 2,79-2,72 (m, 1H), 2,72-2,65 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,94-1,88 (m, 2H), 1,73-1,68 (m, 2H), 1,68-1,56 (m, 4H), 0,85 (t, J = 7,0 Гц, 3H); МС (ESI) $[M+H]^+$ 505,5.

N-((4,6-Диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метил-5-(1-метилпіперидин-4-іл)етиніл)бензамід



До розчину *N*-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-3-(етил(тетрагідро-2H-піран-4-іл)аміно)-2-метил-5-(піперидин-4-іл)етиніл)бензаміду (100 мг, 0,198 ммоль) в метанолі (5

мл) додавали 35% формальдегід в H₂O (0,155 мл, 1,98 ммоль) при 0 °С. Після перемішування при 0 °С протягом 10 хвилин додавали ціаноборогідрид натрію (24,9 мг, 0,396 ммоль). Одержану суміш перемішували при 0 °С протягом 1 години. РХ-МС показувала завершення реакції. Реакцію гасили насич. NaHCO₃/солевим розчином та екстрагували EtOAc/гептаном.

Органічну фазу сушили (Na₂SO₄), фільтрували та концентрували. Залишок очищали шляхом хроматографії (10 г колонка, MeOH/ДХМ=1:9, а потім MeOH/7 М NH₃ в MeOH/ДХМ=1:1:8) з одержанням сполуки, вказаної в заголовку (96,0 мг, 93%). ¹H-ЯМР (500 МГц, CD₃OD) δ ppm 7,22 (brs, 1H), 7,08 (brs, 1H), 6,10 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,94-3,87 (m, 2H), 3,35-3,30 (m, 2H), 3,07 (q, J = 7,0 Гц, 2H), 3,04-2,97 (m, 1H), 2,79-2,71 (m, 2H), 2,67-2,58 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,97-1,91 (m, 2H), 1,78-1,67 (m, 4H), 1,64-1,54 (m, 2H), 0,85 (t, J = 7,0 Гц, 3H); МС (ESI) [M+H]⁺ 519,4.

Приклад 2: Протокол та загальні методи біологічного аналізу

Протокол аналізів ферментів дикого типу та мутантних ферментів PRC2

Загальні матеріали. S-аденозилметіонін (SAM), S-аденозилгомоцистеїн (SAH), біцин, KCl, Твін 20, диметилсульфоксид (ДМСО) та желатин шкіри великої рогатої худоби (BSG) придбали у Sigma-Aldrich з максимально високим рівнем чистоти. Дитіотреїтол (DTT) придбали у EMD. ³H-SAM придбали у American Radiolabeled Chemicals з питомою активністю 80 Кі/ммоль. 384-лункові покриті стрептавідином планшети Flashplates придбали у PerkinElmer.

Субстрати. Пептиди, характерні для залишків 21-44 пістону H3 людини, що містять чи то немодифікований лізин 27 (H3K27me0), чи то диметилований лізин 27 (H3K27me2), були синтезовані з С-кінцевою афінною міткою, що складається з гліцинового (G) лінкера та біотинілизованого лізину (K), та С-кінцевим амідним кепом компанією 21st Century Biochemicals. Вказані пептиди очищали шляхом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) до ступеня чистоти, що становить більше 95%, та підтверджували шляхом рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (РХ-МС). Послідовності наведені нижче.

H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(біотин)-амід (SEQ ID NO: 101)

H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(біотин)-амід (SEQ ID NO: 102)

Олігонуклеосоми еритроцитів курчати виділяли з крові курчати згідно з визначеними процедурами.

Рекомбінантні комплекси PRC2. Комплекси PRC2 людини очищали у вигляді 4-компонентних ферментних комплексів, спільно експресованих в клітинах *Spodoptera frugiperda* (sf9) з використанням бакуловірусної системи експресії. Експресованими субодинаціями були EZH2 (NM_004456) дикого типу або Y641F, N, H, S або С-мутанти EZH2, одержані з конструкції EZH2 дикого типу, EED (NM_003797), Suz12 (NM_015355) та RbAp48 (NM_005610). Субодинація EED містила N-кінцеву FLAG-мітку, яку використовували для очистки усього 4-компонентного комплексу від клітинних лізатів sf9. Чистота комплексів відповідала або перевищувала 95% за даними електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-ПААГ) та аналізу на Agilent Bioanalyzer. Вихідні концентрації ферментів (як правило, 0,3 - 1,0 мг/мл) визначали з використанням аналізу методом Бредфорда відносно стандарту - бичачого сироваткового альбуміну (BSA).

Загальна процедура аналізів ферментів PRC2 з використанням пептидних субстратів. Усі аналізи виконували в буфері, що складається з 20 мМ біцину (pH = 7,6), 0,5 мМ DTT, 0,005% BSG та 0,002% Твін 20, приготовленому в день використання. Сполуки в 100% ДМСО (1 мкл) вносили в поліпропіленові 384-лункові планшети з V-подібним дном (Greiner) з використанням Platemate 2 X 3, обладнаного 384-канальною піпетуючою голівкою (Thermo). ДМСО (1 мкл) додавали в колонки 11, 12, 23, 24, рядки А - Н для контролю максимального сигналу, і SAH, відомий продукт та інгібітор PRC2 (1 мкл), додавали в колонки 11, 12, 23, 24, рядки І - Р для контролю мінімального сигналу. Додавали коктейль (40 мкл), що містить фермент PRC2 дикого типу та пептид H3K27me0 або будь-який з Y641-мутантних ферментів та пептид H3K27me2, за допомогою Multidrop Combi (Thermo). Сполуки залишали інкубуватися спільно з PRC2 протягом 30 хвилин при 25 °С, потім додавали коктейль (10 мкл), що містить суміш нерадіоактивного та ³H-SAM, для ініціації реакції (кінцевий об'єм = 51 мкл). В усіх випадках кінцеві концентрації були такими: концентрація ферменту дикого типу або мутантного ферменту PRC2 становила 4 нМ, концентрація SAH в лунках контролю мінімального сигналу становила 1 мМ, і концентрація ДМСО становила 1%. Кінцеві концентрації решти компонентів вказані в таблиці 2 нижче. Аналізи припиняли шляхом додавання нерадіоактивного SAM (10 мкл) до звичайної концентрації 600 мкМ, який розводив ³H-SAM до рівня, при якому його включення в пептидний субстрат більше не було детектованим. Потім 50 мкл реакційної суміші з 384-лункового поліпропіленового планшета переносили в 384-лунковий планшет Flashplate та біотинізовані пептиди залишали зв'язуватися з покритою стрептавідином поверхнею протягом принаймні 1

години перед промиванням три рази 0,1% Твін 20 в пристрої для промивання планшетів Biotek ELx405. Потім планшети зчитували на планшет-ридері TopCount PerkinElmer з вимірюванням кількості ^3H -міченого пептиду, зв'язаного з поверхнею Flashplate, вимірюваного як число розпадів за хвилину (dpm) або, як альтернатива, розглядуваного як число імпульсів за хвилину (cpm).

Таблиця 2:

Кінцеві концентрації компонентів для кожного варіанта аналізу на основі ідентичності EZH2 (EZH2 дикого типу або Y641-мутантний EZH2)

Фермент PRC2 (позначений за ідентичністю EZH2)	Пептид (нМ)	Нерадіоактивний SAM (нМ)	^3H -SAM (нМ)
Дикий тип	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

Загальна процедура аналізу ферменту PRC2 дикого типу з використанням субстрату, який є олігонуклеосомою. Аналізи виконували в буфері, що складається з 20 мМ біцину (pH = 7,6), 0,5 мМ DTT, 0,005% BSG та 0,002% Твін 20, приготовленому в день використання. Сполуки в 100% ДМСО (1 мкл) вносили в поліпропіленові 384-лункові планшети з V-подібним дном (Greiner) з використанням Platemate 2 X 3, обладнаного 384-канальною піпетуючою голівкою (Thermo). ДМСО (1 мкл) додавали в колонки 11, 12, 23, 24, рядки А – Н, для контролю максимального сигналу, і SAH, відомий продукт та інгібітор PRC2 (1 мкл) додавали в колонки 11, 12, 23, 24, рядки І – Р, для контролю мінімального сигналу. Додавали коктейль (40 мкл), що містить фермент PRC2 дикого типу та олігонуклеосому еритроцитів курчати, за допомогою Multidrop Combi (Thermo). Сполуки залишали інкубуватися спільно з PRC2 протягом 30 хвилин при 25 °С, потім додавали коктейль (10 мкл), що містить суміш нерадіоактивного та ^3H -SAM, для ініціації реакції (кінцевий об'єм = 51 мкл). Кінцеві концентрації були такими: концентрація ферменту PRC2 дикого типу становила 4 нМ, концентрація нерадіоактивного SAM становила 430 нМ, концентрація ^3H -SAM становила 120 мМ, концентрація олігонуклеосоми еритроцитів курчати становила 120 нМ, концентрація SAH в лунках контролю мінімального сигналу становила 1 мМ, і концентрація ДМСО становила 1%. Аналіз припиняли шляхом додавання нерадіоактивного SAM (10 мкл) до звичайної концентрації 600 мкМ, який розводив ^3H -SAM до рівня, при якому його включення в субстрат, який був олігонуклеосомою еритроцитів курчати, більше не було детектованим. Потім 50 мкл реакційної суміші з 384-лункового поліпропіленового планшета переносили в 384-лунковий планшет Flashplate та нуклеосому еритроцитів курчати іммобілізували на поверхні планшета, який потім три рази промивали 0,1% Твін 20 в пристрої для промивання планшетів Biotek ELx405. Потім планшети зчитували на планшет-ридері TopCount PerkinElmer з вимірюванням кількості ^3H -міченої олігонуклеосоми еритроцитів курчати, зв'язаної з поверхнею Flashplate, вимірюваної як число розпадів за хвилину (dpm) або, як альтернатива, розглядуваного як число імпульсів за хвилину (cpm).

Розрахунок % інгібування

$$\% \text{інг} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{сп.}} - \text{dpm}_{\text{мін}}}{\text{dpm}_{\text{макс}} - \text{dpm}_{\text{мін}}} \right) \times 100$$

Де dpm = число розпадів за хвилину, сп. = сигнал в аналітичній лунці, і min та max є відповідними контролями мінімального та максимального сигналу.

Чотирипараметричне підганяння IC_{50}

$$Y = \text{Мінімальне значення} + \frac{(\text{Максимальне значення} - \text{Мінімальне значення})}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{коефіцієнт Хілла}}}$$

Де звичайно допускаються коливання максимального значення та мінімального значення, але вони можуть бути зафіксовані на рівні 100 або 0 відповідно при 3-параметричному підганянні. Звичайно допускається коливання коефіцієнта Хілла, але він також може бути зафіксований на рівні 1 при 3-параметричному підганянні. Y є % інгібування, а X є концентрацією сполуки.

Значення IC_{50} для аналізів ферментів PRC2 з використанням пептидних субстратів (наприклад, EZH2 дикого типу та Y641F) представлені в таблиці 3 нижче.

Аналіз метилування WSU-DLCL2

Суспензію клітин WSU-DLCL2 придбали у Німецької колекції мікроорганізмів та клітинних культур (DSMZ, Брауншвейг, Німеччина). Середовище RPMI/Glutamax, пеніцилін-стрептоміцин, термоінактивовану фетальну бичачу сироватку та Д-ФБР придбали у Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США. Буфер для екстракції та буфер для нейтралізації (5×) придбали у Active Motif, Карлсбад, Каліфорнія, США. Антитіла кроля до гістону H3 придбали у Abcam, Кембридж, Масачусетс, США. Антитіла кроля до H3K27me3 та HRP-кон'юговані антитіла до IgG кроля придбали у Cell Signaling Technology, Данверс, Масачусетс, США. «Суперчутливий» субстрат TMB одержували від BioFX Laboratories, Оуїнгс Мілс, Меріленд, США. Бичачий сироватковий альбумін, що не містить IgG, придбали у Jackson ImmunoResearch, Вест Грув, Пенсільванія, США. ФБР з Твін (10× ФБР-Т) придбали у KPL, Гейтерсберг, Меріленд, США. Сірчану кислоту придбали у Ricca Chemical, Арлінгтон, Техас, США. Планшети Immulon для твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) придбали у Thermo, Рочестер, Нью-Йорк, США. Планшети для культур клітин з V-подібним дном придбали у Corning Inc., Корнінг, Нью-Йорк, США. Поліпропіленові планшети з V-подібним дном придбали у Greiner Bio-One, Монро, Північна Кароліна, США.

Суспензію клітин WSU-DLCL2 витримували в живильному середовищі (RPMI 1640 з додаванням 10% об./об. термоінактивованої фетальної бичачої сироватки та 100 одиниць/мл пеніциліну-стрептоміцину) та культивували при 37 °C в атмосфері 5% CO₂. В умовах аналізу клітини інкубували в середовищі для аналізу (RPMI 1640 з додаванням 20% об./об. термоінактивованої фетальної бичачої сироватки та 100 одиниць/мл пеніциліну-стрептоміцину) при 37 °C в атмосфері 5% CO₂ на шейкері для планшетів.

Клітини WSU-DLCL2 висівали в середовищі для аналізу в концентрації 50000 клітин на мл в 96-лункові планшети для культур клітин з V-подібним дном по 200 мкл на лунку. Сполуку (1 мкл) з 96-лункових вихідних планшетів додавали безпосередньо в клітинний планшет з V-подібним дном. Планшети інкубували на шейкері для титрувальних планшетів при 37 °C, 5% CO₂ протягом 96 годин. Після чотирьох днів інкубації планшети центрифугували при 241×g протягом п'яти хвилин та середовище обережно аспірували з кожної лунки клітинного планшета, не розбурхуючи осад клітин. Осад ресуспендували в 200 мкл Д-ФБР та планшети знова центрифугували при 241×g протягом п'яти хвилин. Аспірували надосадову рідину та в кожну лунку додавали холодний (4 °C) буфер для екстракції (100 мкл). Планшети інкубували при 4 °C на орбітальному шейкері протягом двох годин. Планшети центрифугували при 3427×g×10 хвилин. Надосадову рідину (80 мкл на лунку) переносили в відповідну лунку в 96-лунковий поліпропіленовий планшет з V-подібним дном. В поліпропіленовий планшет з V-подібним дном, що містить надосадову рідину, додавали буфер для нейтралізації 5× (20 мкл на лунку). Поліпропіленові планшети з V-подібним дном, що містять неочищений препарат гістонів (CHP), інкубували на орбітальному шейкері × п'ять хвилин. Неочищені препарати гістонів додавали (2 мкл на лунку) в кожну відповідну лунку в паралельні 96-лункові планшети (дублікати) для ELISA, що містять 100 мкл покриваючого буфера (1× ФБР + BSA 0,05% мас./об.). Планшети герметизували та інкубували протягом ночі при 4 °C. Наступного дня планшети три рази промивали 1X ФБР-Т 300 мкл на лунку. Лунки блокували протягом двох годин 300 мкл на лунку розріджувача для ELISA ((ФБР (1×) BSA (2% мас./об.) та Твін 20 (0,05% об./об.)). Планшети три рази промивали 1× ФБР-Т. Для планшета для детектування гістону H3 додавали 100 мкл на лунку антитіл до гістону H3 (Abcam, ab1791), розведених 1:10000 в розріджувачі для ELISA. Для планшета для детектування триметилування H3K27 додавали 100 мкл на лунку анти-H3K27me3, розведених 1:2000 в розріджувачі для ELISA. Планшети інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Планшети три рази промивали 300 мкл 1X ФБР-Т на лунку. Для детектування гістону H3 додавали 100 мкл HRP-кон'югованих антитіл до IgG кроля, розведених 1:6000 в розріджувачі для ELISA, на лунку. Для детектування H3K27me3 додавали 100 мкл HRP-кон'югованих антитіл до IgG кроля, розведених 1:4000 в розріджувачі для ELISA, на лунку. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 90 хвилин. Планшети чотири рази промивали 300 мкл 1× ФБР-Т на лунку. Додавали 100 мкл субстрату TMB на лунку. Планшети з гістоном H3 інкубували протягом п'яти хвилин при кімнатній температурі. Планшети H3K27me3 інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли 1N сірчаною кислотою (100 мкл на лунку). Поглинання для кожного планшета зчитували при 450 нм.

Спочатку визначали співвідношення для кожної лунки:
$$\frac{\text{значення OD450 для H3K27me3}}{\text{значення OD450 для гістону H3}}$$

Кожен планшет містив вісім контрольних лунок для обробки тільки ДМСО (мінімальне інгібування), а також вісім контрольних лунок для максимального інгібування (фонові лунки).

Розраховували середні значення співвідношення для кожного контрольного типу та використовували їх для визначення процента інгібування для кожної тестованої лунки в планшеті. Тестовану сполуку піддавали серійному трикратному розведенню в ДМСО для одержання усього десяти тестованих концентрацій, починаючи з 25 мкМ. Визначали процент інгібування та одержували криві IC₅₀ з використанням дублікатів лунок для кожної концентрації сполуки. Значення IC₅₀ для даного аналізу представлені в таблиці 3 нижче.

Процент інгібування = 100-

$$\left(\frac{((\text{Співвідношення індивід. тестованого зразка}) - (\text{Середн. фонове співвідношення}))}{((\text{Мінімальне співвідношення інгібування}) - (\text{Середн. фонове співвідношення}))} \right) * 100$$

Аналіз проліферації клітин

Суспензію клітин WSU-DLCL2 придбали у DSMZ (Німецька колекція мікроорганізмів та клітинних культур, Брауншвейг, Німеччина). Середовище RPMI/Glutamax, пеніцилін-стрептоміцин, термоінактивовану фетальну бичачу сироватку придбали у Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США. Поліпропіленові 384-лункові планшети з V-подібним дном придбали у Greiner Bio-One, Монро, Північна Кароліна, США. 384-лункові білі непрозорі планшети для культур клітин придбали у Perkin Elmer, Уолтем, Масачусетс, США. Cell-Titer Glo® придбали у Promega Corporation, Медісон, Вісконсин, США. Планшет-ридер SpectraMax M5 придбали у Molecular Devices LLC, Саннівейл, Каліфорнія, США.

Суспензію клітин WSU-DLCL2 витримували в живильному середовищі (RPMI 1640 з додаванням 10% об./об. термоінактивованої фетальної бичачої сироватки) та культивували при 37 °C в атмосфері 5% CO₂. В умовах аналізу клітини інкубували в середовищі для аналізу (RPMI 1640 з додаванням 20% об./об. термоінактивованої фетальної бичачої сироватки та 100 одиниць/мл пеніциліну-стрептоміцину) при 37 °C в атмосфері 5% CO₂.

Для оцінки впливу сполук на проліферацію лінії клітин WSU-DLCL2 клітини, що експоненціально ростуть, висівали в 384-лункові білі непрозорі планшети з щільністю 1250 клітин/мл в звичайному об'ємі 50 мкл середовища для аналізу. Підготовлювали вихідний планшет зі сполукою шляхом проведення 3-кратних серійних розведень з одержанням розчинів 9 концентрацій, одержаних в трьох повторях, в ДМСО, починаючи з 10 мМ (кінцева максимальна концентрація сполуки в аналізі становила 20 мкМ, а для ДМСО становила 0,2%). 100 нл аліквоту з вихідного планшета зі сполукою додавали в відповідну лунку в клітинному планшеті. Контроль, що демонструє 100% інгібування, складався з клітин, оброблюваних 200 нМ звичайною концентрацією стауроспорину, та контроль, що демонструє 0% інгібування, складався з клітин, оброблюваних ДМСО. Після додавання сполук аналітичні планшети інкубували протягом 6 днів при 37 °C, 5% CO₂, відносній вологості >90% протягом 6 днів. Життєздатність клітин вимірювали по квантуванню АТФ, присутнього в культурах клітин, додаючи 35 мкл реагенту Cell Titer Glo® в клітинні планшети. Люмінесценцію зчитували на SpectraMax M5. Концентрацію, що інгібує життєздатність клітин на 50%, визначали з використанням 4-параметричного підганяння нормалізованих кривих доза-відповідь. Значення IC₅₀ для даного аналізу також представлені в таблиці 3 нижче. Мас-спектральні дані для даних сполук також наведені в таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

№ сполуки	ELISA H3K27me3, IC50 (мкМ)	Проліферація WSU, IC50 (мкМ)	WT EZH2, IC50 (мкМ)	IC ₅₀ EZH2, пептид v2 (мкМ)	МС (вільна форма)
1	0,077	0,0230		<0,005	588,37
2	0,11043	0,38533		0,01498	605,81
105	0,058-0,150	0,325	<0,01	0,0084	518,3257

Приклад 3: Виведення найменшої цитотоксичної концентрації (LCC)

Точно визначено, що проліферація клітин відбувається шляхом поділу клітини, який приводить до подвоєння кількості клітин після поділу по відношенню до кількості клітин до поділу. При фіксованому наборі умов навколишнього середовища (наприклад, pH, іонна сила, температура, щільність клітин, вміст білків та факторів росту в середовищі тощо) клітини будуть проліферувати шляхом послідовного подвоєння (тобто поділу) згідно з таким рівнянням, за умови, що присутня достатня кількість живильних речовин та інших необхідних факторів.

$$N_t = N_0 \times 2^{\frac{t}{t_D}} \quad (\text{A.1})$$

де N_t є кількістю клітин в момент часу (t) після початку періоду спостереження, N_0 є кількістю клітин на початку періоду спостереження, t є часом після початку періоду спостереження, t_D є часовим інтервалом, необхідним для подвоєння клітин, також називаним часом подвоєння. Рівняння A.1 може бути перетворене на більш зручну форму експоненціального рівняння по

$$N_t = N_0 e^{\frac{0.693t}{t_D}} \quad (\text{A.2})$$

Константа швидкості проліферації клітин (k_p) зворотно пропорційна часу подвоєння, як показано нижче.

$$k_p = \frac{0.693}{t_D} \quad (\text{A.3})$$

Об'єднання рівнянь A.2 та A.3 приводить до

$$N_t = N_0 e^{k_p t} \quad (\text{A.4})$$

Таким чином, згідно з рівнянням A.4 очікується, що кількість клітин буде експоненціально збільшуватися з часом під час раннього періоду росту клітин, називаного логарифмічною фазою росту. Експоненціальні рівняння, подібні рівнянню A.4, можна лінеаризувати, узявши натуральний логарифм кожної частини.

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) + k_p t \quad (\text{A.5})$$

Таким чином, очікується, що графік залежності $\ln(N_t)$ від часу дасть висхідну пряму лінію з нахилом, рівним k_p , та відрізком, відтятим на осі Y, рівним $\ln(N_0)$.

Зміни умов навколишнього середовища можуть привести до змін швидкості проліферації клітин, які піддаються кількісному визначенню як зміни константи швидкості проліферації k_p . До умов, які можуть привести до зміни швидкості проліферації, належить введення в систему антипроліферативної сполуки на початку періоду спостереження (тобто при $t = 0$). Коли антипроліферативна сполука чинить негайний вплив на проліферацію клітин, очікують, що графіки залежності $\ln(N_t)$ від часу як і раніше будуть лінійними при усіх концентраціях сполуки зі зменшенням значень k_p при збільшенні концентрацій сполуки.

В залежності від механізму антипроліферативної дії деякі сполуки можуть не одразу викликати зміну швидкості проліферації. Замість цього, може спостерігатися період затримки, перед тим як сполука почне діяти. В таких випадках графік залежності $\ln(N_t)$ від часу буде двофазним і можна буде визначити момент часу, в який починається дія сполуки, у вигляді точки злому між фазами. Незалежно від того, чи є дія сполуки на проліферацію негайною, або вона починається після періоду затримки, константу швидкості проліферації при кожній концентрації сполуки найкраще визначати по нахилу кривої залежності $\ln(N_t)$ від часу від моменту часу, при якому починається дія сполуки, до кінця періоду спостереження в експерименті.

Сполука, яка наноситься на клітини, що ростуть, може впливати на спостережувану проліферацію одним з двох загальних способів: шляхом інгібування подальшого поділу клітин (цитостаз) або шляхом знищення клітин (цитотоксичність). Якщо сполука є цитостатичною, підвищення концентрації сполуки буде зменшувати значення k_p доти, поки не припиниться подальший поділ клітин. В цей момент швидкість росту клітин і, отже, значення k_p буде дорівнювати нулю. З іншого боку, якщо сполука є цитотоксичною, то значення k_p буде складатися з двох констант швидкості: константи швидкості для продовжуваного росту клітин в присутності сполуки (k_g) та константи швидкості для знищення клітин сполукою (k_d). Таким чином, загальна константа швидкості проліферації у випадку фіксованої концентрації сполуки буде різницею між абсолютними значеннями даних протилежних констант швидкостей.

$$k_p = |k_g| - |k_d| \quad (\text{A.6})$$

У випадку концентрацій сполуки, при яких швидкість росту клітин перевищує швидкість знищення клітин, величина k_p буде мати позитивне значення (тобто $k_p > 0$). У випадку концентрацій сполуки, при яких швидкість росту клітин нижче швидкості знищення клітин, величина k_p буде мати негативне значення (тобто $k_p < 0$), і кількість клітин буде зменшуватися з часом, що вказує на сильну цитотоксичність. Коли k_g точно відповідає k_d , загальна константа швидкості проліферації, k_p , буде мати значення, рівне нулю. Таким чином, можна визначити

найменшу цитотоксичну концентрацію (LCC) як таку концентрацію сполуки, яка приводить до значення k_p , рівного нулю, оскільки будь-яка концентрація більше даної буде приводити до чітко спостережуваної цитотоксичності. *Увага:* у випадку концентрацій нижче LCC є ймовірність того, що буде відбуватися знищення клітин, але зі швидкістю, меншою за швидкість проліферації залишкових клітин. В даному випадку обробка не спрямована на визначення біологічних особливостей дії сполуки. Навпаки, в даному випадку метою є просто визначення практичного параметра, за допомогою якого можна об'єктивно кількісно визначити концентрацію сполуки, при якій швидкість знищення клітин перевищує ріст нових клітин. Дійсно, LCC є контрольною точкою або критичною концентрацією, вище якої спостерігається виражена цитотоксичність, а не цитотоксичною концентрацією як такою. В цьому відношенні LCC можна розглядати подібно іншим фізичним контрольним показникам, таким як критична концентрація мицелотворення (СМС), використовувана для визначення концентрації ліпиду, детергенту або інших поверхнево-активних речовин, вище якої усі молекули включаються в мицелярні структури.

Традиційно, вплив антипроліферативних сполук на ріст клітин найчастіше кількісно визначали по значенню IC_{50} , яке визначається як концентрація сполуки, що знижує швидкість проліферації клітин до половини, спостережуваної за відсутності сполуки (тобто для контрольного зразка, який є носієм або розчинником). Однак IC_{50} не дозволяє досліднику розрізняти цитостатичні та цитотоксичні сполуки. LCC, навпаки, легко дозволяє провести таку відмінність, а також кількісно визначити концентрацію, при якій відбувається перехід до стійкої цитотоксичної поведінки.

Якщо часове вікно спостереження обмежують вікном між початком дії та кінцем експерименту, то дані будуть, в цілому, добре придатними для лінійного рівняння у випадку відображення на графіку у вигляді залежності $\ln(N_t)$ від часу (див. вище). З відповідностей даного типу може бути визначено значення k_p у випадку кожної концентрації тестованої сполуки. Перебудований графік залежності значення k_p від концентрації сполуки ($[I]$) буде мати форму низхідної ізотерми з максимальним значенням k_{max} при $[I] = 0$ (визначеним по контрольному зразку, який є носієм або розчинником) та мінімальним значенням k_{min} при нескінченній концентрації сполуки.

$$k_p = \frac{(k_{max} - k_{min})}{1 + \frac{[I]}{I_{mid}}} + k_{min} \quad (A.7)$$

где I_{mid} є концентрацією сполуки, яка дає значення k_p посередині між значеннями k_{max} та k_{min} (слід відзначити, що значення I_{mid} не є тим самим, що й IC_{50} , за винятком випадку цілком та повністю цитостатичної сполуки). Таким чином, підганяння даних перебудованого графіка до рівняння A.7 дозволяє оцінити k_{max} , k_{min} та I_{mid} . Якщо сполука є цитостатичною (як визначено в даному описі), значення k_{min} не може бути менше нуля. Для цитотоксичних сполук k_{min} буде менше нуля, а абсолютне значення k_{min} буде напряду зв'язане з ефективністю сполуки по відношенню до знищення клітин.

Підібрані значення, одержані з рівняння A.7, можна також використовувати для визначення значення LCC. За визначенням, коли $[I] = LCC$, $k_p = 0$. Таким чином, в даних умовах рівняння A.7 перетворюється на

$$0 = \frac{(k_{max} - k_{min})}{1 + \frac{LCC}{I_{mid}}} + k_{min} \quad (A.8)$$

Алгебраїчне перетворення рівняння A.8 дозволяє одержати рівняння для LCC.

$$LCC = I_{mid} \left[\left(\frac{k_{max} - k_{min}}{-k_{min}} \right) - 1 \right] \quad (A.9)$$

Даний аналіз легко виконувати за допомогою програмного забезпечення для підганяння нелінійних кривих і його можна використовувати під час аналізів активності сполук на основі клітин на протязі усього процесу пошуку та розробки лікарських засобів. Таким чином, LCC може стати цінним показником для оцінки залежності активності сполуки від її структури (SAR).

Приклад 4: Аналізи *in vivo*
Миші

Вік самок мишей лінії SCID[®] Fox Chase (CB17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrl, Charles River Laboratories) або безтимусних мишей лінії nude (Crl:NU(Ncr)-Foxn1nu, Charles River Laboratories) становив 8 тижнів, а маса тіла (MT) перебувала в діапазоні 16,0-21,1 г в 1 день дослідження.

Тварин забезпечували водою без обмеження (зворотний осмос 1 ppm Cl) та харчуванням NIH 31 Modified and Irradiated Lab Diet®, що складається з 18,0% сирого білка, 5,0% сирого жиру та 5,0% сирової клітковини. Тварин утримували на опроміненій підстилці Enrich-o-cobs™ в стаціонарних мікроізоляторах в умовах 12-годинного світлового циклу при 21-22 °C (68–72 °F) та вологості 40-60%. Усі процедури виконували згідно з рекомендаціями Посібника з утримання та використання лабораторних тварин (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*) щодо знерухомлювання, умов утримання, оперативних втручань, регулювання корму та рідини, та ветеринарної допомоги.

Культура клітин пухлини

Лінії клітин лімфоми людини одержували з різних джерел (ATCC, DSMZ), наприклад, Karpas-422 одержували від DSMZ. Лінії клітин зберігали у вигляді суспензійних культур в середовищі RPMI-1640, що містить 100 одиниць/мл натрієвої солі пеніциліну G, 100 г/мл стрептоміцину, 1% HEPES та 1% L-глутаміну. До вказаного середовища додавали 20% фетальної бичачої сироватки. Клітини культивували в колбах для тканинних культур у зволоженому інкубаторі при 37 °C, в атмосфері 5% CO₂ та 95% повітря.

Імплантація пухлини *in vivo*

Лінії клітин лімфоми людини, наприклад, клітини Karpas-422, збирали під час середини логарифмічної фази росту та ресуспендували в базових середовищах RPMI-1640 та 50% Матригелі™ (BD Biosciences) (RPMI:Матригель = 1:1). Кожна миша одержувала 1×10⁷ клітин (0,2 мл суспензії клітин) підшкірно в правий бік. Пухлини вимірювали штангенциркулем в двох вимірах для контролю росту, коли середній об'єм наближався до бажаного діапазону 80-120 мм³. Розмір пухлини в мм³ розраховували у такий спосіб:

$$\text{Об'єм пухлини} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

де w = ширина і l = довжина пухлини, в мм. Масу пухлини можна оцінити за допомогою припущення, що 1 мг еквівалентний 1 мм³ об'єму пухлини. Через 10-30 днів мишей з пухлинами 145-150 мм³ розподіляли по групах лікування із середнім об'ємом пухлини 147 мм³.

Тестовані препарати

Тестовані сполуки зберігали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Кожний день лікування одержували свіжі композиції сполук шляхом суспендування порошків в 0,5% натрійкарбоксиметилцелюлозі (NaCMC) та 0,1% Твін® 80 в деіонізованій воді. Носій, 0,5% NaCMC та 0,1% Твін® 80 в деіонізованій воді, використовували для лікування контрольних груп згідно з тими самими схемами. Композиції зберігали в захищеному від світла місці при 4 °C перед введенням. Якщо не вказано інше, зазначені сполуки, які тестували в даному експерименті, були у формі конкретних солей, вказаних в даному абзаці.

План лікування

Мишей лікували дозами сполук в діапазоні 62,5-500 мг/кг два рази на добу (2 рази на добу кожні 12 годин) через шлунковий зонд на протязі різної кількості днів. Кожну дозу доставляли в об'ємі 0,2 мл/20 г миші (10 мл/кг) та коригували згідно з останньою зареєстрованою масою окремих тварин. Максимальна тривалість лікування становила 28 днів.

Середній об'єм пухлини (MTV) та аналіз інгібування росту пухлини (TGI)

Ефективність лікування визначали в останній день лікування. Для кожної групи визначали MTV(n), середній об'єм пухлини для визначеної кількості тварин, n , оцінюваний в останній день. Процент інгібування росту пухлини (%TGI) може бути визначений декількома способами. Згідно з першим способом різницю між MTV(n) вказаної контрольної групи та MTV(n) групи, що отримувала лікування лікарським засобом, виражають у вигляді процента від MTV(n) контрольної групи:

$$\%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{\text{контроль}} - MTV(n)_{\text{лікування}}}{MTV(n)_{\text{контроль}}} \right) \times 100$$

Інший спосіб розрахунку %TGI полягає в тому, що враховують зміну розміру пухлини з 1 дня по день n , при цьому n є останнім днем лікування.

$$\%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{\text{контроль}} - \Delta MTV_{\text{лікування}}}{\Delta MTV_{\text{контроль}}} \right) \times 100$$

$$\Delta MTV_{\text{контроль}} = MTV(n)_{\text{контроль}} - MTV(1)_{\text{контроль}}$$

$$\Delta MTV_{\text{лікування}} = MTV(n)_{\text{лікування}} - MTV(1)_{\text{лікування}}$$

Токсичність

Масу тіла тварин визначали кожен день в дні 1-5, а потім два рази на тиждень до завершення досліджень. Мишей часто оглядали на предмет явних ознак будь-яких небажаних

побічних ефектів, зв'язаних з лікуванням, які документували. Прийнятну токсичність для максимальної переносної дози (MTD) визначали як середню втрату маси тіла в групі, що складає менше 20% під час тестування, та не більше 10% летальності в результаті смерті, зв'язаної з лікуванням (TR). Смерть класифікують як TR, якщо вона зв'язана з побічними ефектами лікування, про що свідчать клінічні ознаки та/або аутопсія, або викликана невідомими причинами під час періоду введення доз. Смерть класифікують як не зв'язану з лікуванням (NTR), якщо є підтвердження тому, що смерть не зв'язана з побічними ефектами лікування. NTR-смерть під час інтервалу між введенням доз, як правило, буде віднесена до категорії NTRa (внаслідок нещасного випадку або помилки з боку людини) або NTRm (внаслідок підтвердженого аутопсією розповсюдження пухлини шляхом інвазії та/або метастазування). Тварини, що отримують лікування перорально, які вмирають з невідомих причин під час періоду введення доз, можуть бути класифіковані як NTRu, коли показники групи не підтверджують віднесення до класу TR, а аутопсія для виключення помилки, зв'язаної з введенням доз, не є можливою.

Одержання зразків

В 7 або 28 день під час досліджень у мишей забирали зразки попередньо визначеним способом для оцінки цільового інгібування пухлин. Пухлини збирали у вказаних мишей в умовах з відсутністю РНКаз та розсікали. Заморожену пухлинну тканину кожної тварини піддавали миттєвому заморожуванню в рідкому N_2 та здрібнювали з використанням ступки та товкачика.

Статистичний та графічний аналіз

Усі статистичні та графічні аналізи виконували за допомогою Prism 3.03 (GraphPad) для Windows. Для перевірки статистичної значущості між контрольними групами та групами, що отримували лікування, на протязі усього часу лікування використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з повторними вимірами з подальшим апостеріорним критерієм множинного порівняння Даннета або двофакторний ANOVA. Prism надає результати у вигляді незначущих (ns) при $P > 0,05$, значущих (позначені «*») при $0,01 < P < 0,05$, дуже значущих («**») при $0,001 < P < 0,01$ та у вищому ступені значущих («***)» при $P < 0,001$.

Екстракція гістонів

Для виділення гістонів 60-90 мг пухлинної тканини гомогенізували в 1,5 мл буфера для ядерної екстракції (10 мМ Трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 25 мМ KCl, 1% Тритону X-100, 8,6% сахарози, а також таблетка інгібітора протеаз 1836145 Roche) та інкубували на льоді протягом 5 хвилин. Ядра збирали шляхом центрифугування при $600 \times g$ протягом 5 хвилин при $4^\circ C$ та один раз промивали ФБР. Видаляли надосадову рідину та екстрагували гістони 0,4 Н холодною сірчаною кислотою протягом однієї години при перемішуванні на вортексі кожні 15 хвилин. Екстракти освітляли шляхом центрифугування при $10000 \times g$ протягом 10 хвилин при $4^\circ C$ та переносили в чисту мікроцентрифужну пробірку, що містить $10 \times$ об'єм льодяного ацетону. Гістони осаджували при $-20^\circ C$ протягом 2 годин - протягом ночі, осаджували шляхом центрифугування при $10000 \times g$ протягом 10 хвилин та ресуспендували у воді.

ELISA

Гістони одержували в еквівалентних концентраціях в покривному буфері (ФБР + 0,05% BSA) з одержанням $0,5 \text{ нг/мкл}$ зразка, та 100 мкл зразка або стандарту додавали в двох повторях в два 96-лункових планшети для ELISA (Thermo Labsystems, Immulon 4HBX #3885). Планшети герметизували та інкубували протягом ночі при $4^\circ C$. Наступного дня планшети промивали $3 \times 300 \text{ мкл/лунку}$ ФБР-Т (ФБР + 0,05% Твін 20; $10 \times$ ФБР-Т, KPL #51-14-02) в пристрої для промивання планшетів Bio Tek. Планшети блокували 300 мкл/лунку розріджувача (ФБР + 2%BSA + 0,05% Твін 20), інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин та промивали $3 \times$ ФБР-Т. Усі антитіла розводили в розріджувачі. В кожний планшет додавали 100 мкл/лунку анти-H3K27me3 (CST #9733, 50% вихідний розчин гліцерину 1:1000) або антитіла до загального H3 (Abcam ab1791, 50% гліцерин 1:10000). Планшети інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі та промивали $3 \times$ ФБР-Т. 100 мкл/лунку анти-Rb-IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 7074) додавали в розведенні 1:2000 в планшет H3K27Me3 і в розведенні 1:6000 в планшет H3, та інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Планшети промивали $4 \times$ ФБР-Т. Для детектування додавали 100 мкл/лунку субстрату TMB (BioFx Laboratories, #TMBS) та планшети інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Реакцію зупиняли 100 мкл/лунку $1N H_2SO_4$. Поглинання при 450 нм зчитували на ридері для мікропланшетів SpectraMax M5.

7-денне ФД дослідження

Для тестування того, чи може сполука модулювати гістонову мітку H3K27me3 в пухлинах *in vivo*, мишей з ксенотрансплантатними пухлинами Каграс-422 лікували сполукою в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 або 500 мг/кг, два рази на добу, або носієм (згідно зі

- схемою введення два рази на добу) протягом 7 днів. В кожній групі було 5 тварин. Тварин піддавали евтаназії через 3 години після введення останньої дози, і пухлина зберігали в замороженому стані, як описано вище. Після екстракції гістонів зразки включали в аналізи ELISA з використанням антитіл до триметилованого стану гістону H3K27 (H3K27me3) або загального гістону H3. На основі цих даних розраховували відношення глобально метилованого до загального H3K27. середні співвідношення глобального метилування для усіх груп, виміряні шляхом ELISA, показують цільовий діапазон інгібування у порівнянні з носієм. План даного експерименту представлений в таблиці 4А.

Таблиця 4А

Схема введення доз

Група	N	Лікування	Доза (мг/кг)	Дозування	Шлях введення доз	Режим
1	5	Носій	--	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
2	5	Сполука 1	62,5	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
3	5	Сполука 1	83,3	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
4	5	Сполука 1	125	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
5	5	Сполука 1	166,7	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
6	5	Сполука 1	250	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
7	5	Сполука 1	333,3	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
8	5	Сполука 1	500	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
9	5	Сполука А*	125	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7
10	5	Сполука А	250	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×7

*Сполука А є N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-5-(етил(тетрагідро-2Н-піран-4-іл)аміно)-4-метил-4'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксамідом.

Приклад 5: Дослідження ефективності зі збільшенням доз в ксенотрансплантатній моделі Karpas-422

Для тестування того, чи може сполука індукувати протипухлинний ефект *in vivo*, мишей з ксенотрансплантатними пухлинами Karpas-422 лікували сполукою в дозах, що складають, наприклад, 62,5, 125, 250 або 500 мг/кг, два рази на добу протягом 28 днів. В кожній групі було 10 мишей для забезпечення ефективності експерименту. Вимірювали ріст пухлини на протязі курсу лікування, що складав 28 днів, для груп, що отримували лікування носієм та тестованою сполукою.

Гістони екстрагували з пухлин, зібраних в кінці дослідження в 28 день для когорти оцінки ефективності (через 3 години після введення останньої дози для обох когорт). Метильну мітку H3K27me3 оцінювали на предмет модуляції при лікуванні в залежності від дози.

План даного експерименту представлений в таблиці 4В.

Таблиця 4В

Схема введення доз

Група	N	Лікування	Доза (мг/кг)	Дозування	Шлях введення доз	Режим
1	10	Носій	--	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28
2	10	Сполука 1	62,5	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28
3	10	Сполука 1	125	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28
4	10	Сполука 1	250	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28
5	10	Сполука 1	500	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28
6	10	Сполука А*	250	10 мкл/г	перорально	два рази на добу ×28

*Сполука А є N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-5-(етил(тетрагідро-2Н-піран-4-іл)аміно)-4-метил-4'-(морфолінометил)-[1,1'-біфеніл]-3-карбоксамідом.

Об'єм пухлини розраховували на основі вимірів штангенциркулем по формулі для об'єму витягнутого еліпсоїда $(L \times W^2)/2$, де L та W є відповідними ортогональними вимірами довжини та

ширини (мм).

Дані виражали у вигляді середнього значення \pm стандартний відхил (SD). Різниця в об'ємі пухлини між групами, що отримували лікування носієм, та тими, що отримували лікування сполукою, аналізували шляхом дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторними вимірами з додатковим критерієм множинного порівняння типу Даннетта. Значення $P < 0,05$ (двобічний) вважається статистично значущим. Статистичні аналізи виконували з використанням пакета програмного забезпечення Prism 5, версія 5.04 (GraphPad Software, Inc., Каліфорнія, США).

Вказані вище дослідження показали, що як сполука 1, так і сполука А демонстрували зупинення росту та регресію пухлини в ксенотрансплантатній моделі Karpas-422, та добре переносилися. Див., наприклад, Фіг. 1 та 2. Крім того, фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості сполуки 1 або сполуки А з вищевказаних досліджень проілюстровані на Фіг. 3-8. Фіг. 3 є графіком, що демонструє концентрацію сполуки 1 в пухліні в 7 день або 28 день після лікування або концентрацію сполуки А в пухліні в 7 день після лікування. На даній фігурі «А» - «G» позначають 7 днів після введення сполуки 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; «H» та «I» позначають 7 днів після введення сполуки А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно; «J» - «L» позначають 28 днів після введення сполуки 1 в дозах, що складають 62,5, 125 та 250 мг/кг, відповідно. Примітка: для зразків в 28 день пухлини були занадто малими для аналізу в групі, що отримувала лікування 250 мг/кг сполуки А, та групі, що отримувала лікування 500 мг/кг сполуки 1; тільки 1 з 10 та 5 з 10 були достатньо великими для аналізу в групах, що отримували лікування 250 мг/кг сполуки 1 та 125 мг/кг сполуки 1, відповідно. Фіг. 4 є графіком, що демонструє концентрацію сполуки 1 або сполуки А в плазмі крові в 7 день або 28 день після лікування. Верхня пунктирна лінія показує LCC сполуки А з поправкою на PPB, а нижня пунктирна лінія показує LCC сполуки 1 з поправкою на PPB. Фіг. 5 є графіком, що демонструє глобальне метилування H3K27me3 в пухлинах KARPAS-422 у мишей, яких лікували сполукою 1 або сполукою А протягом 7 днів. На даній фігурі «А» позначає лікування носієм; «В» - «H» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; «I» та «J» позначають лікування сполукою А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно. Фіг. 6 є графіком, що демонструє глобальне метилування H3K27me3 в пухлинах KARPAS-422 у мишей, яких лікували сполукою 1 протягом 28 днів. Фіг. 7 є графіком, що демонструє глобальне метилування H3K27me3 в кістковому мозку мишей з ксенотрансплантатними пухлинами KARPAS-422, яких лікували сполукою 1 або сполукою А протягом 7 днів. На даній фігурі «А» позначає лікування носієм; «В» - «H» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3 та 500 мг/кг, відповідно; «I» та «J» позначають лікування сполукою А в дозах, що складають 125 та 250 мг/кг, відповідно. Фіг. 8 є графіком, що демонструє глобальне метилування H3K27me3 в кістковому мозку мишей з ксенотрансплантатними пухлинами KARPAS-422, яких лікували сполукою 1 протягом 28 днів. На даній фігурі «А» позначає лікування носієм; «В» - «E» позначають лікування сполукою 1 в дозах, що складають 62,5, 125, 250 та 500 мг/кг, відповідно; «F» позначає лікування сполукою А в дозі, що складає 250 мг/кг.

В прикладах 6-8 нижче експерименти та аналізи проводили з використанням способів та методів, аналогічних описаним, наприклад, в J. Lin, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6):1089-1116; L. Di et al., *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(6):469-76; M. Fonsi et al., *Journal of Biomolecular Screening*, 2008, 13:862; E. Sjögren et al., *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40:2273-2279; T.D. Bjornsson, et al., *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(7):815-832; J.B. Houston and K.E. Kenworthy, *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(3):246-254; та S.W. Grimm et al., *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7):1355-1370, повний зміст кожної з яких включений в даний опис шляхом посилання.

Приклад 6: Оцінка метаболічної стабільності в мікосомях печінки

Метаболічну стабільність сполук 1, 2 та 105 оцінювали в мікосомях печінки п'яти видів, включаючи мишей, щурів, собак, мавп та людей.

Методи: здійснювали інкубацію в 96-лункових планшетах, що містять 250 мкл загального об'єму, що складається з 100 ммоль/л калійфосфатного буферу (pH 7,4), 1 мг/мл мікосом печінки, тестованої сполуки (тобто сполук 1, 2 або 105) в 8 концентраціях та 2 мг/мл НАДФН. Концентрації сполук, використовуваних для інкубації, перебували в діапазоні від 45,7 нМ до 100 мкМ. Додавання НАДФН використовували для початку реакції, та інкубацію здійснювали на струшувальній водянній бані при 37 °C протягом до 60 хвилин. Реакції зупиняли шляхом додавання рівного об'єму стоп-розчину, що містить внутрішній стандарт (IS). Потім зразки центрифугували на центрифугі з охолодженням при 3000 об/мин протягом не менш 5 хвилин перед аналізом. Ступінь виснаження в інкубаційних сумішах для тестованої сполуки, визначену шляхом використання РХ/часпролітної мас-спектрометрії (TOFMS), використовували для визначення значень власного кліренсу за допомогою мікосом печінки. Системи РХ/TOFMS

складалися з автоматичного пробовідбирника Shimadzu SIL-HTC (Киото, Японія), двох pomp LC-20AD (Shimadzu Corp.) та термостата колонки (CTO-20AC; Shimadzu Corp.) з часпролітним мас-спектрометром (AB SCIEX Qstar Elite, AB Sciex, Фостер-Сіті, Каліфорнія). Площі піків тестованої сполуки та IS інтегрували за допомогою Analyst QS (версія 2.0, Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія, США). Активовану зіткненнями дисоціацію (CAD) з використанням азоту використовували для генерації іонів продукту. Оптимізовані параметри обладнання були в режимі позитивної іонізації.

Кількісне визначення шляхом PX/MC/MC було оснований на співвідношеннях площ піків тестованої сполуки та IS. Для розрахунку та інтеграції площ піків для сполук 1, 2 або 105 та IS використовували Analyst QS 2.0 (AB Sciex, Фостер-Сіті, Каліфорнія, США). Розрахунки проводили з використанням Excel (Office 2010, Microsoft Corp., Редмонд, Вашингтон, США) та GraphPad Prism v. 5.02 (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія, США). Дані аналізували та представляли на основі відповідних SOP, таких як описані в J. Lin, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6):1089-1116; та Di L et al., *Comb Chem High Throughput Screen*. 2008 11(6):469-76.

Виснаження тестованої сполуки, використовуюваної для значень K_m та V_{max} у випадку мікросом печінки, розраховували шляхом побудови графіка залежності від часу для визначення швидкості виснаження. Потім швидкості виснаження наносили на графік з використанням відповідної кінетичної моделі. Розраховували дані на основі таких рівнянь:

Міхаеліса-Ментен: Cl_{int} (мкл/хв/мг мікросом печінки) = V_{max} / K_m

Хілла: Cl_{int} (мкл/хв/мг мікросом печінки) = $Cl_{max} = V_{max} / K_s \cdot (n - 1) / (n(n - 1)^{1/n})$

Cl_{int} (мкл/хв/г печінки) = Cl_{int} (мкл/хв/мг мікросом) · масштабний коефіцієнт або Cl_{int} (мкл/хв/10⁶ клітин) · масштабний коефіцієнт.

Результати наведені в таблиці 5 нижче.

Таблиця 5

	Визначений власний кліренс (мл/хв/кг)				
	Миша	Щур	Собака	Яванський макак	Людина
Сполука 1	15,4	14,8	8,1	58,6	10,5
Сполука 105	54,7	47,5	64,2	74,8	42,1
Сполука 2	17,6	14,8	34,3	32,8	8,8

Усі три тестувані сполуки, тобто сполуки 1, 2 та 105, демонстрували низький метаболічний кліренс в мікросомах печінки людини (HLM). Також спостерігали видові відмінності метаболічного кліренсу. Яванські макаки, в цілому, демонстрували більш високий кліренс, ніж інші види.

Приклад 7: Оцінка індукції CYP

Оцінювали індукцію для кожної зі сполук 1, 2 та 105 в кріоконсервованих гепатоцитах людини від одного донора.

Методи: гепатоцити одержували від BD Biosciences (Уоборн, Масачусетс, США), а відповідні середовища та ядерний барвник DAPI придбали у Life Technologies (Дарем, Північна Кароліна, США). Модифіковане способом Дульбекко середовище Ігла (DMEM), фосфатний буферний розчин Дульбекко (Д-ФБР), замінні амінокислоти 100× MEM, 100× розчин пеніциліну/стрептоміцину/глутаміну, 2× трипановий синій придбали у Mediatech (Манассас, Вірджинія, США). Фетальну бичачу сироватку (FBS) придбали у Tissue Culture Biologicals (Тулар, Каліфорнія, США). 24-лункові планшети, покриті колагеном, для аналізу мРНК придбали у BD Biosciences (Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Попередньо розроблені зонди та праймери використовували в двох потрібних аналізах для оцінки зміни мРНК. Позитивними контролями були β-нафтофлавіон для CYP1A (1 та 10 мкмоль/л), фенобарбітал для CYP2B6 (100 мкмоль/л та 1 ммоль/л) та рифампіцин для CYP2C9 та CYP3A (1 та 10 мкмоль/л). ДМСО використовували як контроль носієм (негативний контроль). Аналізи, специфічні по відношенню до форми CYP, виконували після періоду лікування, і клітини підраховували для визначення життєздатності.

Кріоконсервовані гепатоцити відтаювали на водяній бані при 37 °C та висівали згідно з інструкціями виробника. Одну пробірku з гепатоцитами додавали в 50 мл конічну пробірku, що містить середовище для видобування кріоконсервованих гепатоцитів (CHRM) від Life Technologies. Клітини центрифугували на центрифугу Beckman з ротором GH 3.8 при 800 об/хв

протягом 10 хвилин. Надосадову рідину видаляли та клітини ресуспендували в середовищах для планшетів для підрахунку. Після підрахунку клітини ресуспендували в кількості 0,75 мільйони життєздатних клітин/мл. Суспензію (0,5 мл/лунку) додавали в 24-лунковий планшет, покритий колагеном, або після додавання 60 мкл DMEM, що містить 10% FBS, пеніцилін/стрептоміцин/глутамін та замінні амінокислоти MEM, 80 мкл суспензії додавали в кожну лунку 96-лункового планшета, покритого колагеном. Після перемішування та струшування для забезпечення кращого покриття планшета клітини поміщали в інкубатор тканинної культури при 5% CO₂ та 37 °C, і залишали для прикріплення протягом ночі. Потім клітини обробляли з використанням підтримувальних середовищ для гепатоцитів CellDirect. На клітини діяли сполукою 1, 2 або 105 (1 або 10 мкмоль/л), або носієм протягом 48 годин. Під час обробки підтримувальні середовища та тестовані сполуки поповнюли кожні 24 години.

Після завершення інкубації клітини промивали Д-ФБР. Після промивання Д-ФБР клітини фіксували з використанням 3,7% п-формальдегіду в Д-ФБР протягом однієї години. Видаляли формальдегід та додавали 0,6 мкмоль/л DAPI в Д-ФБР. Клітини забарвлювали DAPI протягом 20 хвилин, а потім три рази промивали Д-ФБР. Клітини підраховували з використанням ArrayScan II (Cellomics, Піттсбург, Пенсільванія, США) з 5× лінзою об'єктива. Фракцію гепатоцитів, що залишилися, розраховували з використанням кількості клітин, виявлених в умовах обробки, діленої на клітини, виявлені у випадку контролю носієм.

Після обробки клітини лізували з використанням буфера RLT з набору Qiagen RNeasy. мРНК виділяли з використанням набору RNeasy з обробкою ДНКазою з використанням протоколів виробника. Концентрацію мРНК вимірювали за допомогою Nanodrop ND-1000 (Уілмінгтон, Делавер, США). Концентрацію мРНК нормалізували для кожного зразка в межах донора. Зворотну транскрипцію здійснювали з використанням набору для синтезу кДНК Superscript VILO від Life Technologies, дотримуючись інструкцій виробника. Після синтезу кДНК проводили кількісну ПЛР в реальному часі з використанням системи 7500 Fast Real Time PCR від Applied Biosystems, дочірньої компанії Life Technologies, яка знаходиться в повній власності. Компоненти реакції для ПЛР в реальному часі склалися з: 10 мкл Taqman Fast Advanced Master Mix (Life Technologies), 2 мкл кДНК, 5 мкл води, не що містить нуклеазу (Life Technologies), 1 мкл FAM-міченого HS00984230_m1 для аналізу з обмеженим праймером для β -2 мікроглобуліну, 1 мкл VIC-міченого HS00167927_m1 для CYP1A2 або HS04183483_g1 для CYP2B6 для аналізу з обмеженим праймером та 1 мкл NED-міченого HS04260376_m1 для CYP2C9 або HS00604506_m1 для CYP3A4 для аналізу з обмеженим праймером. Розрахунки кратної різниці у порівнянні з контролем носієм виконували за допомогою програмного забезпечення 7500, версія 2.0.5 (Life Technologies) з використанням методу $\Delta\Delta C_t$. Розрахунки E_{max} та EC₅₀ виконували з використанням GraphPad Prism.

Таблиця 6

Сполука	Концентрація (мкМ)	CYP1A		CYP2B6		CYP2C9		CYP3A		% клітин, що залишилися, по відношенню до контролю
		Кратність індукції	% позитивного контролю	Кратність індукції	% позитивного контролю	Кратність індукції	% позитивного контролю	Кратність індукції	% позитивного контролю	
1	1	1,04	2,8	0,98	18,0	1,04	43,5	1,04	13,9	107,44
	10	1,14	3,0	1,43	26,3	1,26	52,6	0,99	13,3	99,00
2	1	0,73	немає даних	0,61	немає даних	0,57	немає даних	0,59	немає даних	124,70
	10	0,83	немає даних	0,64	немає даних	0,73	немає даних	0,73	немає даних	120,90
105	1	1,14	3,0	1,39	25,5	1,20	50,4	1,35	18,1	103,19
	10	1,65	4,4	2,84	52,2	1,82	76,3	2,52	33,8	97,49

Як показано в таблиці 6 вище, сполука 1 не демонструвала значної індукції (за винятком можливо CYP2C9); сполука 2 не демонструвала індукції (з дещо більш низькою активністю); і сполука 105 демонструвала індукцію CYP2B6, CYP2C9 та CYP3A. Не спостерігали значної втрати життєздатності клітин.

Приклад 8: Оцінка інгібування CYP

Можливе інгібування ферментативної активності цитохромів P450 (CYP) людини сполукою

1, 2 або 105 оцінювали з використанням об'єднаних в пул мікросом печінки людини.

Методи: потенціал сполук 1, 2 та 105 по відношенню до конкурентного інгібування визначали шляхом оцінки в декількох концентраціях в реакціях з маркером CYP поблизу до їх відповідних значень K_m для побудови кривих IC_{50} в мікросомах печінки людини (HLM). Потенціал по відношенню до залежної від часу інактивації (TDI) також оцінювали для CYP3A4/5 шляхом оцінки значень K_i та K_{inact} у відповідних випадках.

Суспензію, що містить PB, HLM, CYP-селективний маркерний субстрат та тестований інгібітор, додавали в 96-лунковий планшет. Планшети попередньо інкубували на водяній бані при 37 °C протягом приблизно 2 хвилин. Реакцію ініціювали шляхом додавання НАДФН в кожен лунку 96-лункового планшета. Кінцеві концентрації для PB, HLM та НАДФН становили 100 ммоль/л (pH 7,4), 0,1 мг/мл та 2,3 ммоль/л, відповідно. Маркерні субстрати CYP та інгібітори CYP, використовувані як позитивні контролю, та їх відповідні концентрації наведені нижче. Кінцева концентрація MeOH, використовувана при кожній інкубації, не перевищувала 0,8%.

Після закінчення відповідного часу інкубації у відповідні лунки додавали рівний об'єм гасильного розчину, що містить IS. Стандартні зразки та зразки контролю якості (QC) готували з використанням аналогічних компонентів, що й тестовані зразки. Холосту пробу одержували з використанням аналогічного гасильного розчину, що й для інших зразків, але який не містить IS. Планшети центрифугували протягом 5 хвилин на настільній центрифугі при 3000 об/хв. Зразки аналізували шляхом RX/MC/MC. Умови інкубації та позитивні контролю наведені в таблиці 7 нижче.

Таблиця 7

Тестований CYP	Маркерний субстрат CYP	Конц. суб. (ммоль/л)	Інгібітор CYP (позитивний контроль)	Макс. інгіб. конц. (ммоль/л)	Час інкуб. (хв)	Внутрішній стандарт (RX/MC/MC)
CYP1A2	Фенацетин	40	Фурафілін	20	10	¹³ C ₂ , ¹⁵ N-ацетамінофен
CYP2B6	Бупропіон	140	Тиклопідін	5	10	² H ₆ -гідроксибупропіон
CYP2C8	Амодіахін	10	Монтелукаст	12	10	² H ₃ -дезетиламодіахін
CYP2C9	Толбутамід	100	Сульфафеназол	20	10	² H ₉ -гідрокситолбутамід
CYP2C19	(S)-мефенітоїн	30	(S)-Бензилнірванол	8	10	² H ₃ -4'-гідроксимефенітоїн
CYP2D6	(±)-Буфуралол	20	Хінідин	2	5	² H ₉ -1'-гідроксибуфуралол
CYP3A4/5	Мідазолам	3	Кетоконазол	1	5	¹³ C ₃ -1'-гідроксимідазолам
	Тестостерон	70				(R)-пропранолол

Для оцінки TDI, первинної інкубації, суспензію, що містить PB, HLM та вихідні розчини інгібіторів, додавали в 96-лунковий планшет. Планшети попередньо інкубували на водяній бані при 37 °C протягом приблизно 2 хвилин. Реакцію ініціювали шляхом додавання НАДФН в кожен лунку 96-лункового планшета та проводили протягом 0, 5, 10, 15, 20 та 30 хвилин. Для контролей, що не містять НАДФН, розчин PB заміняли на вихідний розчин НАДФН. Кінцеві концентрації для PB, HLM та НАДФН становили 100 ммоль/л (pH 7,4), 0,2 мг/мл та 2,3 ммоль/л, відповідно. У відповідні моменти часу 12,5 мкл суспензії для первинної інкубації 20-кратно розводили з одержанням попередньо інкубованої суміші для вторинної інкубації, що містить CYP-селективні маркерні субстрати, для оцінки залишкової активності. Використовуваними маркерними субстратами були тестостерон (250 ммоль/л), а позитивним контролем був тропандоміцин.

Використовуваною системою BEPX була система BEPX Shimadzu (Киото, Японія), що складається з автоматичного пробовідбірника SIL-HTC, дегазатора DGU-14A, трьох pomp LC-10ADvp та термостата колонки CTO-10ACvp. Зразки аналізували на мас-спектрометрі з трьома квадрупольними лінзами API4000QTrap (AB Sciex, Фостер-Сіті, Каліфорнія) з використанням іонізації розпиленням в режимі визначення позитивних іонів.

Розрахунок та інтеграцію площ піків для усіх контрольованих метаболітів та IS проводили за допомогою Analyst 1.6 (AB Sciex, Фостер-Сіті, Каліфорнія). Кількісне визначення здійснювали з використанням калібрувальних кривих, побудованих шляхом побудови графіка залежності

співвідношення площ піків метаболіта та ІS від концентрацій калібрувальних стандартів, та проводили за допомогою квадратичної регресії з $1/x^2$ заданням ваги ($y = ax^2 + bx + c$). В розрахунках процента інгібування використовували Excel (Office 2010, Microsoft Corp., Редмонд, Вашингтон) та дані наносили на графік з використанням GraphPad Prism (версія 5.02, GraphPad Software, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія) виходячи з одного сайта зв'язування. Номінальні концентрації тестованих сполук та позитивних контролей піддавали логарифмічному перетворенню в GraphPad Prism. Оцінювали швидкість втрати активності СYP (λ) з використанням графіків залежності залишкової активності СYP3A4/5 від часу попередньої інкубації шляхом нелінійної регресії. Потім оцінювали параметри k_{inact} та K_i шляхом підганяння до такого рівняння:

$$\lambda = \frac{k_{inact} [I]}{K_i + [I]}$$

де $[I]$ є початковою концентрацією сполуки 1, 2 або 105.

Таблиця 8

Оборотне інгібування

Сполука	IC ₅₀ (мкМ)						
	CYP1A	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 Мідазолам	CYP3A4/5 Тестостерон
1	>100	>100	>100	89,57	22,94	40,46	>100
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
105	>100	47,43	75,66	33,65	2,95	9,67	>100

Таблиця 9

Оцінка залежної від часу інактивації (TDI)

Сполука	K_i (мкМ)	k_{inact} (хв ⁻¹)	k_{inact} / K_i (мкМ ⁻¹ ·хв ⁻¹)
1	6,4 (3,3**)	0,0277	0,0043
105	10,2	0,0214	0,0021
2	22,3	0,0376	0,0017

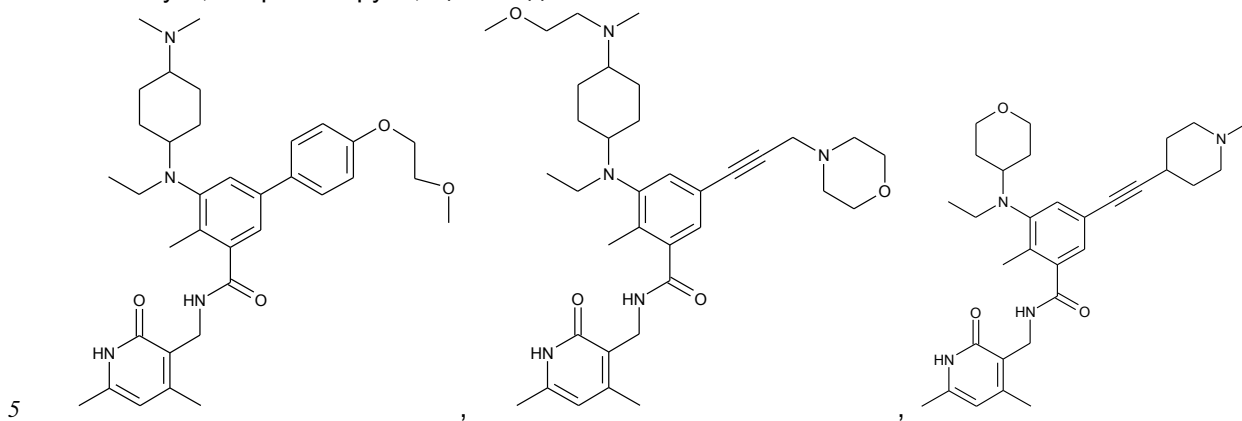
Як показано в таблиці 8 вище, сполуки 1 та 2 не демонстрували значного оборотного інгібування; а сполука 105 демонструвала потенційно значуще інгібування СYP2D6 та СYP3A4 (мідазолам). Крім того, як показано в таблиці 9 вище, усі сполуки 1, 2 та 105 демонстрували час-, концентрація- та НАДФН-залежну інактивацію СYP3A4/5 (з використанням мідазолама як маркера).

Повний зміст кожного з патентних документів та наукових статей, вказаних в даному описі, включений шляхом посилання для усіх цілей.

Даний винахід може бути реалізований в інших конкретних формах в межах його суті або суттєвих характеристик. Відповідно, наведені вище варіанти реалізації є в усіх відношеннях ілюстративними, а не обмежувачими даний винахід, описаний в даному документі. Таким чином, обсяг даного винаходу визначається прикладеною формулою винаходу, а не наведеним вище описом, і усі зміни, які подпадають під значення та діапазон еквівалентності формули винаходу, включені до нього.

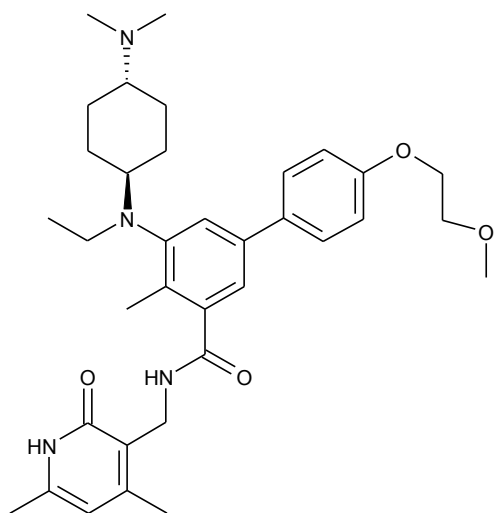
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука, вибрана з групи, що складається з



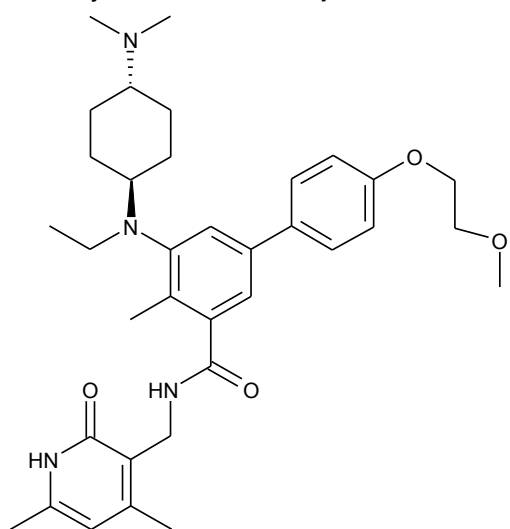
та їх фармацевтично прийнятних солей.

2. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є

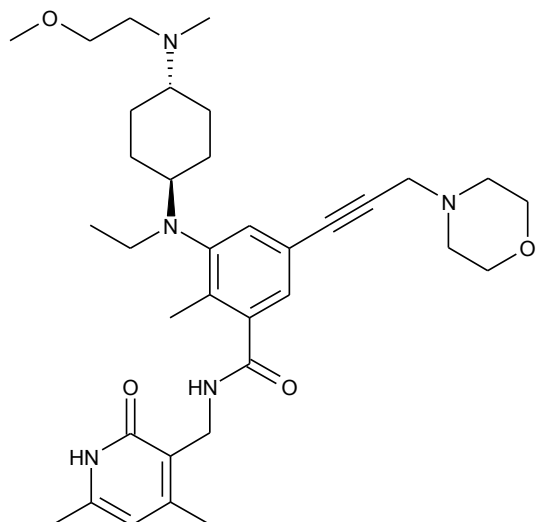


або її фармацевтично прийнятною сіллю.

10 3. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є

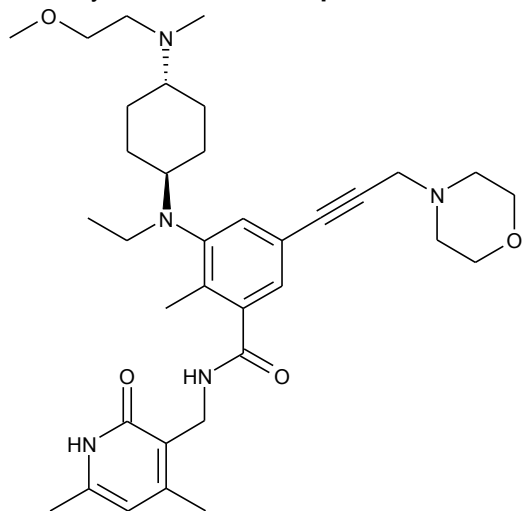


4. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є

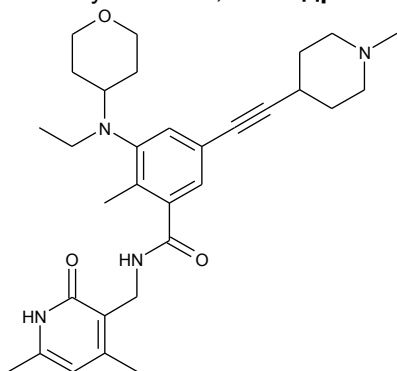


або її фармацевтично прийнятною сіллю.

5. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є

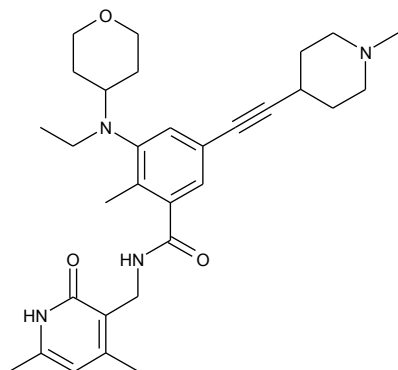


5 6. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є



або її фармацевтично прийнятною сіллю.

7. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана сполука є



8. Фармацевтична композиція, що містить сполуку за будь-яким з пп. 1-7 та фармацевтично прийнятний носій.

9. Спосіб лікування EZH2-опосередкованого порушення, який включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-7.

10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що EZH2-опосередковане порушення є раком.

11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що рак є лімфомою, лейкозом або меланомою.

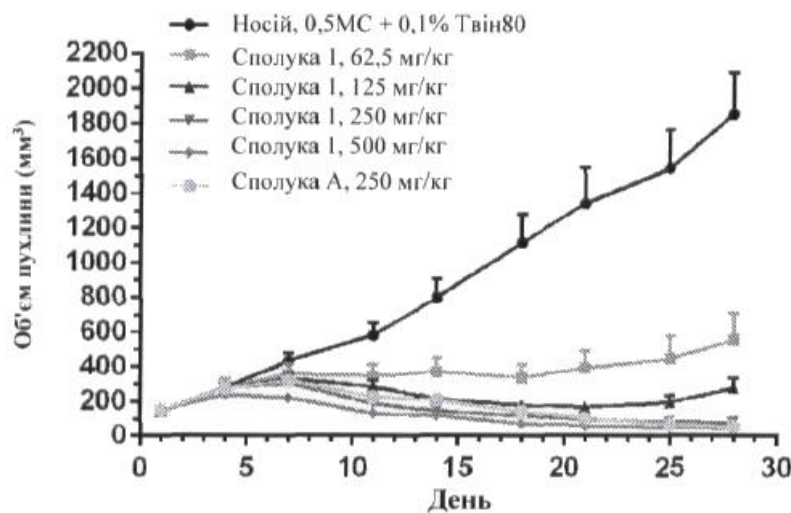
12. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що рак є дифузною великоклітинною В-клітинною лімфомою (ДВВЛ), неходжкінською лімфомою (НХЛ), фолікулярною лімфомою, хронічним мієлогенним лейкозом (ХМЛ), гострим мієлоїдним лейкозом, гострим лімфоцитарним лейкозом, недиференційованим лейкозом або мієлодиспластичними синдромами (МДС).

13. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що рак є злоякісною рабдоїдною пухлиною або пухлиною з дефіцитом INI1.

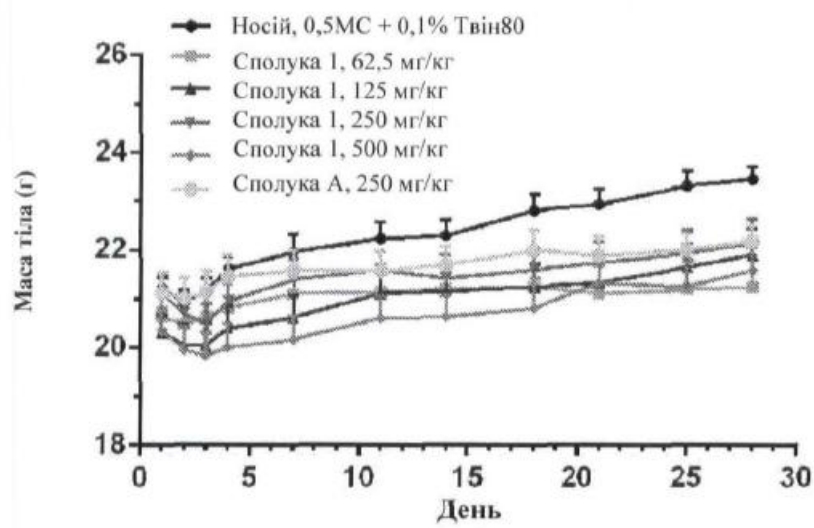
14. Сполука за будь-яким з пп. 1-7 для застосування в способі лікування EZH2-опосередкованого порушення.

15. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-7 для виготовлення лікарського засобу для лікування EZH2-опосередкованого порушення.

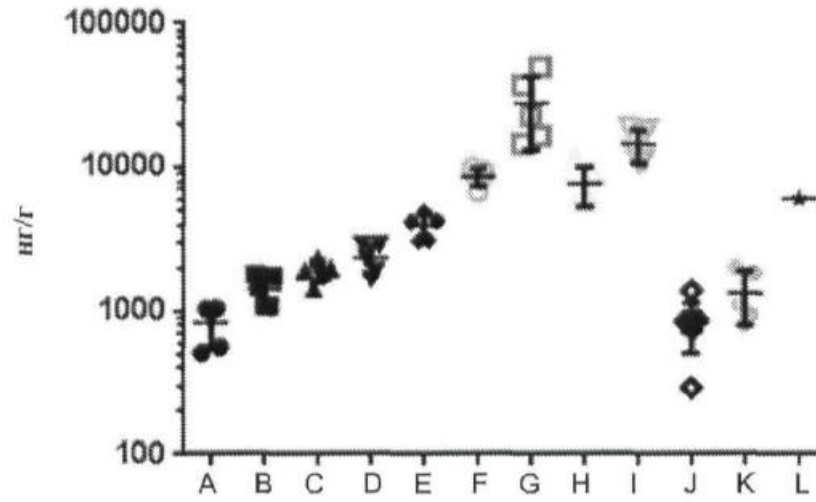
16. Фармацевтична композиція для лікування EZH2-опосередкованого порушення, що містить сполуку за будь-яким з пп. 1-7 як основний інгредієнт.



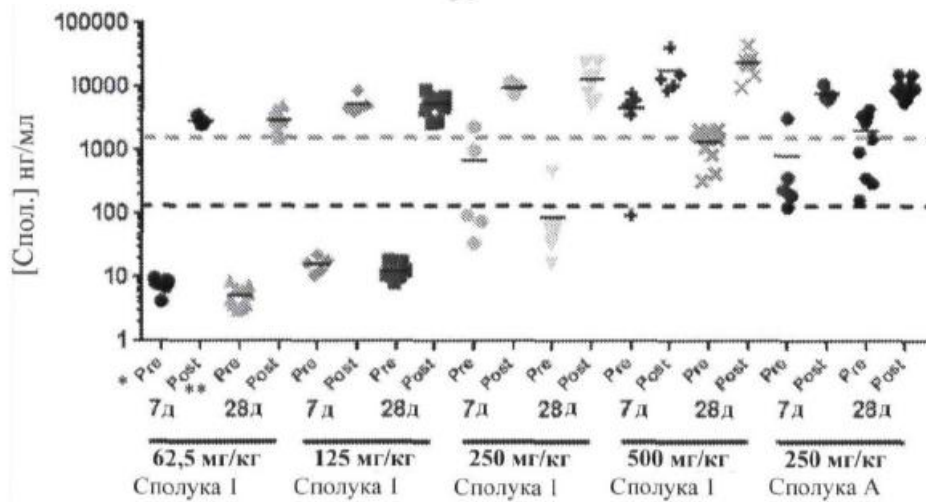
Фігура 1



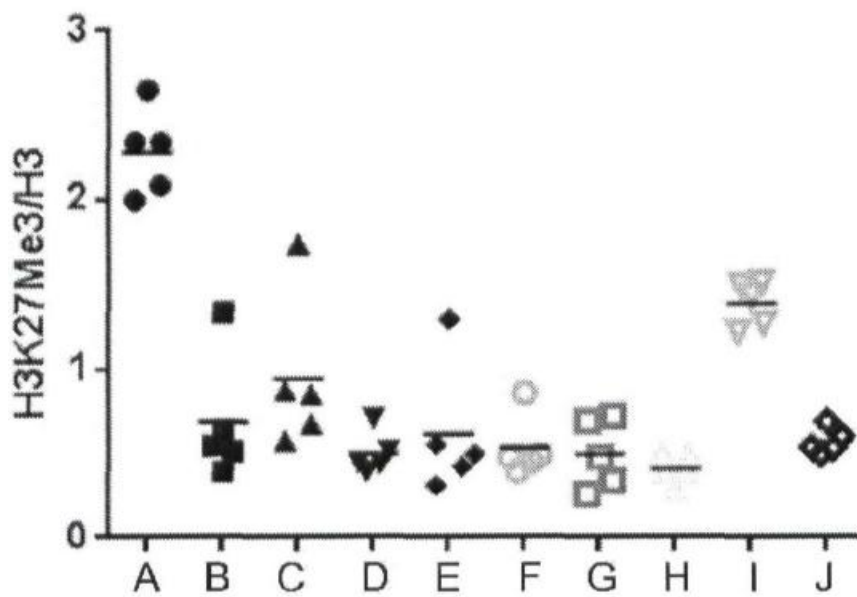
Фігура 2



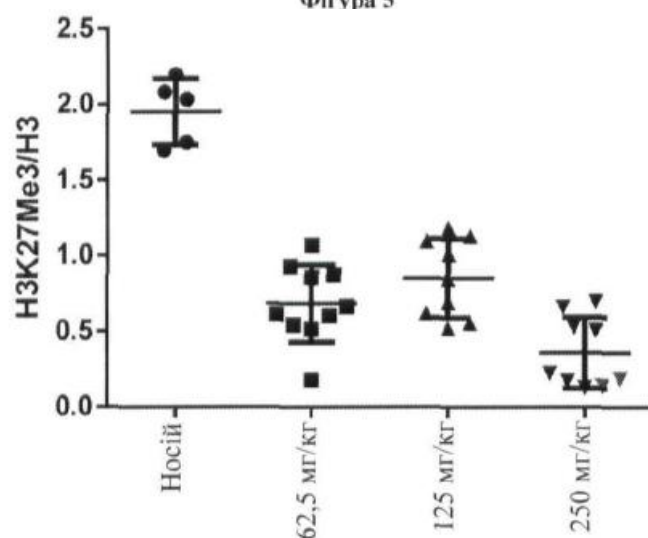
Фігура 3



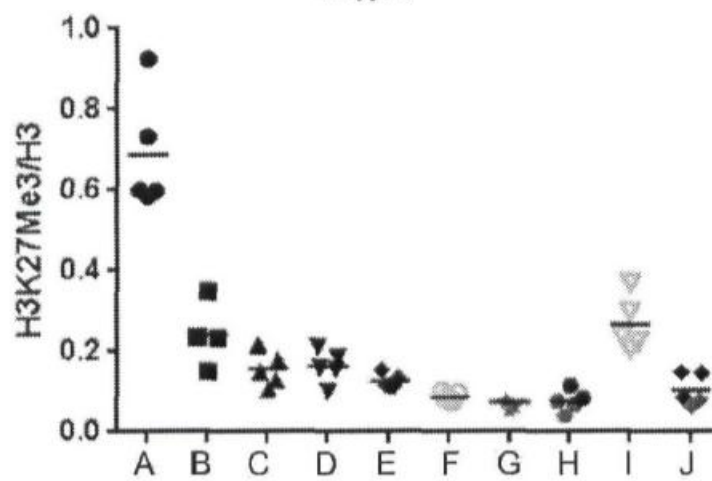
Фігура 4



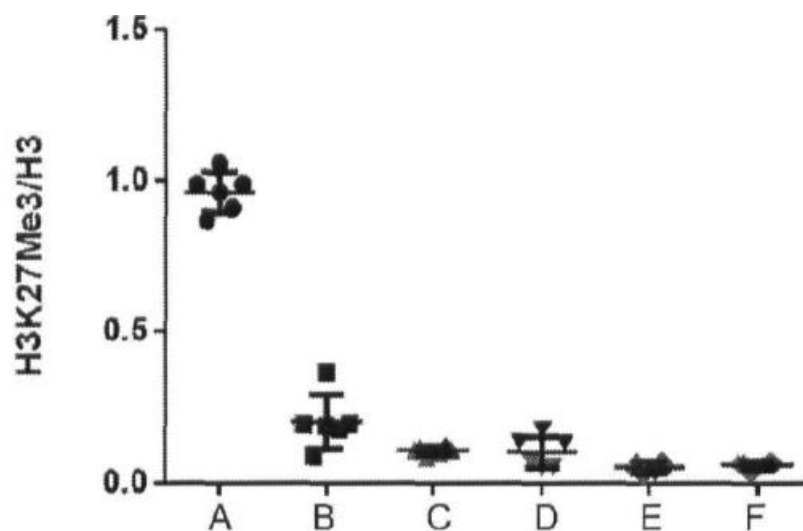
Фігура 5



Фігура 6



Фігура 7



Фігура 8

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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