

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **026409**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2017.04.28**

**(21)** Номер заявки  
**201490800**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2012.10.15**

**(51)** Int. Cl. **C07D 223/08** (2006.01)  
**A61K 31/55** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

**(54) СОЕДИНЕНИЕ, ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕУБИКВИТИНИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ, И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕГО В КОМПОЗИЦИИ И В СПОСОБЕ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

**(31)** 1100776-2; 1200303-4

**(32)** 2011.10.19; 2012.05.16

**(33)** SE

**(43)** 2014.09.30

**(86)** PCT/SE2012/000158

**(87)** WO 2013/058691 2013.04.25

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ВИВОЛЮКС АБ (SE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Линдер Стиг, Ларссон Рольф (SE)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

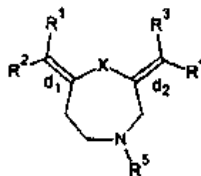
**(56)** WO-A2-2007007207

ROMAGNOLI, R., BARALDI, P.G., et al. "Symmetrical alfa-bromoacryloylamido diaryldienone derivatives as a novel series of antiproliferative agents. Design, synthesis and biological evaluation", 2010, Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 20, p. 2733-2739.; whole document; chart 1, compounds 1a and 1b.

BERNDTSSON, M., BEAUJOUIN, M., et al. "Induction of the lysosomal apoptotic pathway by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system", 2009, Vol. 124, p. 1463-1469.; whole document; figure 1c  
WO-A1-2011005790

ALEO, E., HENDERSON, C.J., et al. "Identification of new compounds that trigger apoptosome-independent caspase activation and apoptosis", 2006, Cancer Res., Vol. 66, No. 18, p. 9235-9244; whole document; figure 1a and 5a  
WO-A1-2007059613

**(57)** Соединение общей структуры (I), где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  и  $R^5$  такие, как описаны в формуле изобретения, способно аннулировать деубиквитиновую (DUB) активность 19S RP DUB. Соединение можно применять для лечения рака, в частности рака, не восприимчивого к лечению современной химиотерапией. Также раскрыты соответствующие способы лечения и фармацевтическая композиция, содержащая данное соединение.

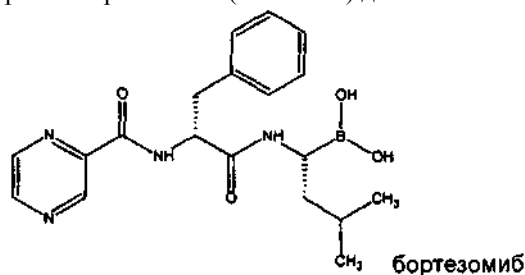
**B1****026409****026409****B1**

### Область изобретения

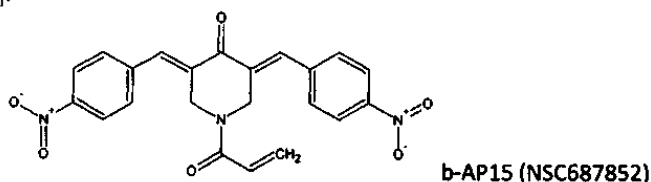
Изобретение относится к соединению, способному аннулировать деубиквитинирующую активность 19S RP DUB. Изобретение также касается способа лечения у пациента рака, который оказывается устойчивым к лечению по меньшей мере одним противораковым лекарственным средством, и фармацевтической композиции, содержащей данное соединение.

### Предпосылки изобретения

Опухолевые клетки демонстрируют повышенную чувствительность к нарушениям в убиквитин-протеасомной системе (УПС), делая ее привлекательной мишенью для разработки противораковых методов лечения [1]. Убиквитин-меченые субстраты разрушаются 26S протеасомой, мультисубъединичным комплексом, содержащим протеолитическое ядро 20S (20S CP), покрытое регуляторными частицами 19S (19S RP) [2, 3]. 20S CP эволюционировало как важная мишень для разработки противораковых лекарств, следствием чего является одобрение бортезомиба (Velcade®) для лечения миелоидного лейкоза [4].



Известно, что соединение b-AP15 (NSC687852) индуцирует p53-независимый и (катепсин-D)-зависимый апоптоз [5, 6].



### Цели изобретения

Целью изобретения является получение соединения для применения в способе лечения рака у пациента посредством ингибирования деубиквитинирующей активности, в частности рака, не восприимчивого к современной химиотерапии.

В частности, целью изобретения является получение такого соединения для лечения у пациента рака, невосприимчивого к лечению, по меньшей мере, бортезомибом или агентом, участвующим в механизме бортезомиба по ингибированию деубиквитинирующей активности.

Другой целью изобретения является получение соединения упоминаемого выше вида, которое обладает повышенной растворимостью при физиологическом pH относительно функционально эквивалентных соединений, известных в данной области.

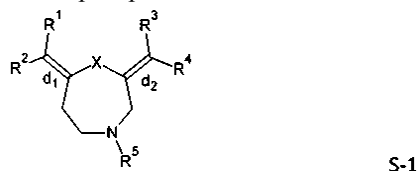
Дополнительной целью изобретения является обеспечение соответствующего способа.

Еще одной целью изобретения является получение фармацевтической композиции, содержащей данное соединение.

Дополнительные цели изобретения станут очевидны при изучении следующего краткого содержания изобретения, ряда предпочтительных вариантов, проиллюстрированных на чертежах, и приложенной формулы изобретения.

### Краткое содержание изобретения

Согласно настоящему изобретению раскрыто соединение общей структуры S



способное аннулировать деубиквитинирующую (DUB) активность 19S RP DUB.

Считают, что соединение по изобретению относится к новому классу ингибиторов протеасом, типичным представителем которых является известное соединение b-AP15.

В частности, согласно настоящему изобретению соединение по изобретению ингибирует активность двух 19S RP DUB, UCHL5 и USP14, не влияя на непротеасомные DUB. Более конкретно, соединение по изобретению является эффективным при лечении раковой опухоли, не восприимчивой к современной химиотерапии вследствие чрезмерной экспрессии собственного ингибитора апоптоза Bcl-2.

Более конкретно, согласно настоящему изобретению соединение по изобретению является эффективным при лечении рака, не восприимчивого к лечению бортезомибом или агентом, участвующим в

механизме бортезомиба по ингибированию деубиквитинирования. В другом предпочтительном варианте соединение является эффективным при лечении рака, не восприимчивого к любому противораковому препарату, известному в данной области.

В этом изобретении выражение "не восприимчивый к лечению" означает, что лечение рака посредством одной дозы противоракового лекарства не снижает существенно скорость роста рака, наблюдаемую непосредственно до начала лечения, например снижая скорость роста за месяц не более чем на 25, или 10, или даже 5% или менее. В частности, способ по изобретению является эффективным при лечении рака у пациента, который после приема одной или более, в частности двух или трех, стандартных доз бортезомиба, или агента, участвующего в апоптоз-генерирующей активности бортезомиба, или любого другого противоракового препарата, демонстрирует скорость роста рака за месяц, сниженную не более чем на 25, или 10, или даже 5% или менее, например любую положительную скорость роста, по сравнению со скоростью роста рака, наблюдаемой непосредственно до разовой обработки или до последней из двух, трех или большего количества обработок соответственно. Признанной мерой роста опухоли является изменение объема нераспространенного рака.

Примером рака, поддающегося лечению способом по изобретению, является множественная миелома. Другие примеры рака, поддающегося лечению, включают рак легких, рак простаты, рак толстой кишки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак шеи и головы.

В соединении по изобретению общей структуры S-1:

$R^1$ ,  $R^2$  при двойной связи d1 и  $R^3$ ,  $R^4$  при двойной связи d2 могут независимо друг от друга иметь конфигурацию, противоположную конфигурации формулы S-1;

X обозначает CO, CS, CH<sub>2</sub>, CHC<sub>1-6</sub>алкил, NH или NC<sub>1-6</sub>алкил;

$R^1$  и  $R^3$  независимо друг от друга обозначают H или C<sub>1-6</sub>алкил;

$R^2$  и  $R^4$  независимо друг от друга обозначают H; C<sub>1-6</sub>алкил; C<sub>1-5</sub>алкил-CO; фенил или 6-членный гетероарил, необязательно замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих: C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкокси, CN, COO-C<sub>1-6</sub>алкил, COOH, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-C<sub>1-6</sub>алкил, N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>, CONR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, при условии, что один или более H в алкиле и алкокси могут быть замещены атомом фтора;

$R^5$  обозначает H, C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>2-6</sub>алкенил, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>2-6</sub>алкил-, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>2-6</sub>алкенил-, арил-C<sub>0-6</sub>алкил-, гетероарил-C<sub>0-6</sub>алкил-, гетероцикл-ил-C<sub>0-6</sub>алкил-, циклоалкил-C<sub>0-6</sub>алкил-, -C<sub>1-6</sub>алкил-COO-C<sub>1-6</sub>алкил-, -C<sub>2-6</sub>алкиларилокси, COR<sup>6</sup>;

$R^6$  выбран из следующих: C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>2-6</sub>алкенил, C<sub>1-6</sub>алкокси, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>1-6</sub>алкил-, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>1-6</sub>алкенил-, арил-C<sub>0-6</sub>алкил-, гетероарил-C<sub>0-6</sub>алкил-, гетероцикл-ил-C<sub>0-6</sub>алкил-, циклоалкил-C<sub>0-6</sub>алкил-, -C<sub>1-6</sub>алкил-COO-C<sub>1-6</sub>алкил, NH<sub>2</sub>, -NH-C<sub>1-6</sub>алкил-, -N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>-, -C<sub>0-6</sub>алкиларилокси;

$R^7$ ,  $R^8$  независимо друг от друга обозначают H или C<sub>1-3</sub>алкил.

Для обоих радикалов  $R^1$  и  $R^3$  предпочтительным значением является C<sub>1-3</sub>алкил.

Для обоих радикалов  $R^2$  и  $R^4$  предпочтительными значениями являются H; C<sub>1-6</sub>алкил; C<sub>1-5</sub>алкил-CO; фенил или 6-членный гетероарил, необязательно замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих: C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкокси, CN, COO-C<sub>1-6</sub>алкил, COOH, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-C<sub>1-6</sub>алкил, N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>, CONR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, при условии, что один или более H в алкиле и алкокси могут быть замещены атомом фтора, и где замещение фенила предпочтительно происходит по одному или нескольким из положений 3, 4, 5.

Для обоих радикалов  $R^2$  и  $R^4$  особо предпочтительным значением является фенил, замещенный по одному или нескольким из положений 3, 4, 5 1-3 заместителями, предпочтительно 1 или 2 заместителями, выбранными из следующих: C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкокси, CN, -COO-C<sub>1-6</sub>алкил, COOH, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-C<sub>1-6</sub>алкил, N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>, CONR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, при условии, что один или более H в алкиле и алкокси могут быть замещены атомом фтора. Наиболее предпочтительными являются электронно-акцепторные заместители, в частности F, Cl, трифторметил, NO<sub>2</sub>, CN.

Для  $R^5$  предпочтительны значения, выбранные из группы, включающей H, метил, ацетил, COOH=CH<sub>2</sub>, 2-ацетоксиэтил.

Согласно предпочтительному аспекту изобретения X=CO. Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения  $R^1$  и  $R^3$ , оба, обозначают H. Согласно третьему предпочтительному аспекту изобретения,  $R^2$  и  $R^4$  независимо друг от друга обозначают фенил или 6-членный гетероарил, необязательно замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих: C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкокси, CN, -COO-C<sub>1-6</sub>алкил, COOH, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-C<sub>1-6</sub>алкил, N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>, CONR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, предпочтительным является фенил, и предпочтительным замещением в фениле, если таковое имеется, является замещение по одному или нескольким из положений 3, 4, 5.

Согласно предпочтительному аспекту изобретения  $R^1$ ,  $R^2$  при двойной связи d1 и  $R^3$ ,  $R^4$  при двойной связи d2 имеют конфигурацию формулы S-1; X обозначает CO, CS, CH<sub>2</sub>, CH-C<sub>1-6</sub>алкил, NH или N-C<sub>1-6</sub>алкил;  $R^1$  и  $R^3$  независимо друг от друга обозначают H или C<sub>1-6</sub>алкил;  $R^2$  и  $R^4$  независимо друг от друга обозначают H; C<sub>1-6</sub>алкил; C<sub>1-5</sub>алкил-CO; фенил или 6-членный гетероарил, замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих: CN, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, NH-C<sub>1-6</sub>алкил, N(C<sub>1-6</sub>алкил)<sub>2</sub>, CO-C<sub>1-6</sub>алкил;  $R^5$  обозначает H, C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>2-6</sub>алкенил, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>1-3</sub>алкокси-C<sub>1-6</sub>алкенил, арил, гетероарил, гетероцикл-ил, C<sub>1-6</sub>алкилгетероарил, C<sub>1-6</sub>алкилгетероцикл-ил, C<sub>1-6</sub>алкилциклоалкил,

C<sub>1-6</sub>алкиларил, CO-C<sub>1-6</sub>алкил, CO-винил, CO-аллил, CO-арил, CO-циклоалкил. Независимо друг от друга, предпочтительным значением для X является CO, для R<sup>2</sup> и R<sup>4</sup> - замещенный фенил, для R<sup>5</sup> - значения, выбранные из COR<sup>6</sup>, в частности значения, выбранные из CO-C<sub>1-6</sub>алкила, CO-циклоалкила, CO-винила, CO-аллила.

Термин "арил" относится к моноциклическому или бициклическому углеводороду, имеющему от 6 до 10 атомов углерода и содержащему по меньшей мере один ароматический цикл. Термин "арилокси" относится к арильной группе, связанной с атомом кислорода. Термин "гетероарил" представляет моноциклическую кольцевую систему, имеющую 5 или 6 кольцевых атомов, среди которых один или более независимо выбраны из атома кислорода, азота, серы. Термин "алкил" обозначает линейный или разветвленный алкил. Термин "алкенил" обозначает линейный или разветвленный алкенил. Термин "алкокси" обозначает линейный или разветвленный алкокси. Термин "циклоалкил" относится к насыщенному моноциклическому углеводороду, имеющему от 3 до 7 атомов углерода.

Предпочтительные соединения по изобретению общей структуры S-1 раскрыты в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Предпочтительные соединения по изобретению

X=CO, R<sup>1</sup>=R<sup>3</sup>=H, R<sup>5</sup>=H или алкил

№	R <sup>2</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	НСА116 FMCA IC50 (мкМ)	MeJuSo-UB IncuCyte наименьш. эффект. конц. (мкМ)
1516	фенил	фенил	H		1, 2
1517	4-метоксифенил	4-метоксифенил	H		
1518	4-хлорфенил	4-хлорфенил	H		1, 6
1533	3-ацетилфенил	3-ацетилфенил	H		
1535	3-нитрофенил	3-нитрофенил	H	5, 9	
1536	2-нитрофенил	2-нитрофенил	H	6, 9	
1537	4-нитрофенил	4-нитрофенил	H	4, 1	
1560	4-нитрофенил*	H**	H	1, 0	
1561	4-фторфенил	4-фторфенил	H	1, 0	1

1562	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	Н	0,5	0,25
1563	4-нитрофенил	4-нитрофенил	метил	1,5	0,5
1564	4-фторфенил	4-фторфенил	метил	0,9	16
1565	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	метил	1,5	0,5
1566	3-нитрофенил	3-нитрофенил	метил	2,3	0,5
1574	4-фторфенил	4-фторфенил	пропи л	2,8	0,5
1575	4- нитрофенил	4- метоксифенил	Н	2,1	1
1576	4-фторфенил	4-метоксифенил	Н	1,6	8
1577	4-фторфенил	4-метоксифенил	метил	4,9	8
1582	4-фторфенил	4-хлорфенил	Н	1,7	2
1583	4- хлорфенил	4-нитрофенил	метил	3,3	2
1584	4-хлорфенил	4-нитрофенил	Н	1,8	2
1585	4-фторфенил	4-нитрофенил	Н	1,5	2
1586	4-хлорфенил	4-фторфенил	Н	1,1	0,5
1587	4-фторфенил	4-нитрофенил	метил	3,0	1
1588	4-нитрофенил	4-метоксифенил	метил	3,1	1
1589	4-хлорфенил	4-фторфенил	метил	2,5	1
1590	4-хлорфенил	4-метоксифенил	метил	2,0	1
1591	4-нитрофенил	4-хлорфенил	Н	0,9	0,5
1592	4-хлорфенил	4-нитрофенил	Н	12	4
1593	4-нитрофенил	4-фторфенил	метил	2,9	1
1594	4-нитрофенил	4-хлорфенил	метил	2,6	1
1595	4-фторфенил	4-хлорфенил	метил	2,3	1
1596	4-нитрофенил	4-фторфенил	Н	2,6	2
1608	3-хлоро-4- фторфенил	3-хлоро-4- фторфенил	метил	1,8	1
1609	4-фтор-3-трифтор- метилфенил	4-фтор-3- трифтор- метилфенил	метил	1,4	1
1610	3,4 дифторфенил	3,4- дифторфенил	метил	1,7	1
1611	3-фтор-5- трифторметил фенил	3-фтор-5- трифторметил фенил	Н	1,1	0,5

1612	3-фтор-5-трифторметил фенил	3-фтор-5-трифторметил фенил	метил	0,7	0,25
1613	4-нитрофенил	4-нитрофенил	Н	25	32
1614	4-нитрофенил	4-нитрофенил	метил	7,4	8
1615	4-хлоро-3-трифторметилфенил	4-хлоро-3-трифтор-метилфенил	метил	0,9	0,5
1616	3,4,5-трифторметилфенил	3,4,5-трифтор-метилфенил	метил	1,4	0,5
1617	4-трифторметилфенил	4-трифтор-метилфенил	метил	1,6	1
1618	3-циано-4-фторфенил	3-циано-4-фторфенил	метил	1,5	0,5
1619	3-карбониламинофенил	3-карбонил-аминофенил	Н	30	32
1620	3-нитрофенил	3-нитрофенил	метил	>32	нет эффекта
1621	4-цианофенил	4-цианофенил	метил	4,5	2
1622	4-фтор-3-трифтор-метилфенил	4-фтор-3-трифтор-метилфенил	Н	0,8	0,5
1623	3-циано-4-фтор фенил	3-циано-4-фторфенил	Н	1,0	0,5
1624	3-фтор-4-трифтор-метилфенил	3-фтор-4-трифтор-метилфенил	метил	1,8	1
1625	4-цианофенил	4-цианофенил	Н	0,9	0,5
1626	3-фтор-4-трифтор-метилфенил	3-фтор-4-трифтор-метилфенил	Н	0,8	8

\* или Н, или смесь Н и 4-нитрофенил

\*\* или 4-нитрофенил или смесь Н и 4-нитрофенил

Вследствие протонирования аминогруппы растворимость в водной среде азепаноновых соединений по изобретению, в которых R<sup>5</sup> не является ацилом, а также соответственно замещенных пиперидин-4-онов повышается с уменьшением pH. Однако согласно важному аспекту азепаноновых соединений по изобретению, в которых R<sup>5</sup> не является ацилом (т.е. не является -COR<sup>6</sup>), обладают превосходной растворимостью в водной среде при физиологическом pH по сравнению с соответственно замещенными пиперидин-4-онами. Хотя растворимость этих азепанонов и пиперидин-4-онов увеличивается при переходе от высоких pH к низким pH, для азепанонов увеличение начинается при более высоких значениях pH, чем для соответствующих пиперидин-4-онов. В этом изобретении "физиологические pH" соответствуют значениям pH от 6 до примерно 8, в частности от 7,0 до 7,5.

Таблица 2

Предпочтительные" соединения по изобретению  
 $X=CO$ ,  $R^1=R^3=H$ ,  $R^5=COR^6$

№	$R^2$	$R^4$	$R^6$	hCA116 FMCA IC50 (мкМ)	MeJuSo-UB IncuCyte наименьш. эффект. конц. (мкМ)
1505	4-нитрофенил	4-нитрофенил	2- пирролидинил	5, 2	16
1507	4-нитрофенил	4-нитрофенил	2-(1- карбоксиэтил- этил)	4, 4	8
1520	фенил	фенил	винил		
1521	фенил	фенил	циклобутил		
1525	4- метоксифенил	4- метоксифенил	циклобутил		
1526	4- метоксифенил	4- метоксифенил	циклопропил		
1527	4-хлорфенил	4-хлорфенил	циклобутил		2
1546	4-нитрофенил	4-нитрофенил	винил	1, 2	2
1567	4-нитрофенил	4-нитрофенил	метил	0, 6	0, 5
1568	4-фторфенил	4-фторфенил	винил	1, 5	2
1569	4-фторфенил	4-фторфенил	винил	2, 0	4
1570	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	винил	0, 5	0, 25

1571	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	метил	0,9	0,25
1572	3-нитрофенил	3-нитрофенил	винил	2,5	0,5
1578	4-фторфенил	4- метоксифенил	метил	7,0	8
1579	4-фторфенил	4- метоксифенил	метил	5,9	8
1580	4-нитрофенил	4- метоксифенил	винил	1,5	8
1581	4-нитрофенил	4- метоксифенил	метил	7,2	8
1597	4-нитрофенил	4-хлорфенил	метил	1,3	1
1627	4- трифторметилф енил	4- трифторметил фенил	метил	0,7	1
1628	3,4- дифторфенил	3,4- дифторфенил	метил	2,3	1
1629	3,4,5- трифторфенил	3,4,5- трифторфенил	метил	0,6	1
1630	4-хлоро-3- фторфенил	4-хлоро-3- фторфенил	метил	0,9	0,5
1631	3-хлоро-4- фторфенил	3-хлоро-4- фторфенил	метил	1,0	32
1633	4-хлорфенил	4-хлорфенил	2- ацетоксиэтил	2,2	4
1635	4-хлорфенил	4-хлорфенил	бензил	1,4	2
1636	4-хлорфенил	4-хлорфенил	1-(3-фенил-2- пропенил)	2,0	1
1637	4-хлорфенил	4-хлорфенил	3-пиридил	2,1	2
1638	4-хлорфенил	4-хлорфенил	2-тиофенил	2,0	2
1639	4-хлорфенил	4-хлорфенил	4-гидрокси-3- этоксibenзил	1,2	1
1640	4-хлорфенил	4-хлорфенил	метил-(2- метокси карбоксил) фенил	1,9	1

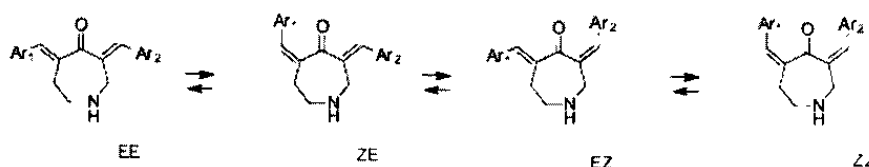
1641	4- трифторметил фенил	4- трифторметил фенил	метил-3- пиридил	2, 7	2
1642	4- трифторметил фенил	4- трифторметил фенил	2-оксо- ацетоксиэтил	1, 2	1
1643	4- трифторметил фенил	4- трифторметил фенил	3- (3- оксопропаноил оксиметил)	0, 9	1
1644	4- трифторметил фенил	4- трифторметил фенил	1-оксо-2- (2- пиридил) этил	1, 4	1
1645	4-хлоро-3- фторфенил	4-хлоро-3- фторфенил	2-оксо- ацетоксиэтил	2, 5	2
1646	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	2-оксо- ацетокси- метил	1, 1	1
1647	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	3- (3-оксо- пропаноил- оксиметил	0, 7	0, 25
1648	4-фтор-3- нитрофенил	4-фтор-3- нитрофенил	1-оксо-2- (2- пиридил) этил	0, 8	0, 5
1649	3, 4, 5- трифторфенил	3, 4, 5- трифторфенил	метил- (2- метокси) карбоксил фенил	0, 9	0, 5
1650	3, 4, 5- трифторфенил	3, 4, 5- трифторфенил	метил-3- пиридил	1, 9	1
1651	3, 4, 5- трифторфенил	3, 4, 5- трифторфенил	2-оксоацеток- сиэтил	0, 8	0, 5
1652	3, 4, 5- трифторфенил	3, 4, 5- трифторфенил	3- (3- оксопропаноил -окси) метил	0, 6	0, 5
1653	3, 4, 5- трифторфенил	3, 4, 5- трифторфенил	1-оксо-2- (2- пиридил) этил	0, 71	1
1654	4-хлор-3- фторметил- фенил	4-хлор-3- фторметил- фенил	метил- (2- метокси- карбоксил)	1, 2	1

			фенил		
1655	4-хлор-3-трифторметил-фенил	4-хлор-3-трифторметил-фенил	метил-3-пиридил	1,0	1
1656	4-хлор-3-трифторметил-фенил	4-хлор-3-трифторметил-фенил	2-оксоацетокси-этил	0,7	0,5
1657	4-хлор-3-трифторметил-фенил	4-хлор-3-трифторметил-фенил	ацетил	0,6	0,5
1658	4-хлор-3-трифторметил-фенил	4-хлор-3-трифторметил-фенил	1-оксо-2-(2-пиридил)этил	0,8	0,5
1659	4-трифторметил-фенил	4-трифторметил-фенил	2-ацетоксиэтил	2,4	2
1660	4-хлор-3-трифтор-фенил	4-хлор-3-трифтор-фенил	2-ацетоксиэтил	2,4	2
1661	4-хлор-3-фторфенил	4-хлор-3-фторфенил	Метил-карбоксил	24	32
1662	4-фтор-3-нитрофенил	4-фтор-3-нитрофенил	2-ацетоксиэтил	2,1	1
1663	4-фтор-3-нитрофенил	4-фтор-3-нитрофенил	метил-карбоксил	3,1	4
1664	3,4,5-трифторфенил	3,4,5-трифторфенил	2-ацетоксиэтил	2,8	4
1665	3,4,5-трифторфенил	3,4,5-трифторфенил	метил-карбоксил	5,0	8
1666	4-хлоро-3-трифтор-метилфенил	4-хлоро-3-трифтор-метилфенил	2-ацетоксиэтил	1,3	1

Растворимость в водной среде соединений по изобретению, в которых  $R^5$  обозначает ацил (т.е.  $-COR^6$ ), существенно зависит от pH.

Особо предпочтительными соединениями по изобретению являются соединения № 1561, 1562, 1567, 1570, 1571, 1586, 1591, 1600, 1612, 1618, 1622, 1625, 1643, 1644, 1647, 1648, 1649, 1652, 1653, 1656, 1657, 1658, 1662. Наиболее предпочтительными соединениями по изобретению являются соединения № 1570, 1571, 1625, 1662.

Поскольку соединение по изобретению содержит фрагмент 1,5-дизамещенный 1,4-пентен-3-он, то оно может существовать в виде четырех цис/трансизомеров EE, ZE, ES, ZZ. Выше при определении соединения по изобретению эту изомерию определяют следующим образом: " $R^1$ ,  $R^2$  при двойной связи d1 и  $R^3$ ,  $R^4$  при двойной связи d2 могут независимо друг от друга иметь конфигурацию, противоположную конфигурации формулы S1". Соединение по изобретению включает любой такой изомер и любую смесь таких изомеров.



При синтезе получают соединение по изобретению в виде смеси изомеров, но иногда также в виде изомера с самой низкой растворимостью в конкретном растворителе, из которого он осаждается или кристаллизуется. Притом что в контролируемых условиях можно таким образом получить чистые изомеры, фармакологический эффект демонстрируют все изомеры соединения. Причиной этого является их равновесие в присутствии воды или другого гидроксил- или сульфгидрилсодержащего растворителя или агента, достижение которого ускоряется посредством кислотного или основного катализа.

Таким образом, используемое здесь выражение "соединение по изобретению" включает чистый изомер вышеупомянутого вида, а также смесь двух или более таких изомеров. Скорость уравнива-

ния соединения по изобретению в водной жидкости организма достаточна для обеспечения, по существу, состояния равновесия в течение периода одной обработки.

Соединение по изобретению содержит азепановый фрагмент, предпочтительно фрагмент азепан-4-он. Согласно важному аспекту изобретения соединение по изобретению демонстрирует цитотоксическую активность, превосходящую активность структурно соответствующего соединения, содержащего пиперидиновый фрагмент, например фрагмент 4-пиперидинон.

Согласно другому важному аспекту изобретения соединение по изобретению, содержащее азепановый фрагмент, в частности фрагмент азепан-4-он, демонстрирует растворимость в жидком носителе, подходящем для введения пациенту, например диметилсульфоксиде, превосходящую растворимость структурно соответствующего соединения, содержащего пиперидиновый фрагмент, например фрагмент 4-пиперидинон.

Выражение "период разовой обработки" обозначает период времени, протекающего между введением соединения по изобретению и его потреблением, т.е. моментом времени, в который концентрация соединения по изобретению на месте действия, например в опухоли, снижена на 90, или 95, или 99% и более. В фармацевтической композиции изомер или смесь изомеров соединения по изобретению стабилизируют от изомеризации посредством тщательного исключения влаги.

Способ по изобретению включает введение нуждающемуся пациенту фармакологически эффективной дозы соединения по изобретению в подходящем фармацевтическом носителе, например, растворенном или суспендированном в водном носителе или в носителе, содержащем диметилсульфоксид или N,N-диметилацетамид. Введение можно производить любым подходящим способом, таким как внутривенная, внутримышечная, внутривнутренняя или подкожная инъекция или инфузия. Также предполагаются другие способы введения, в частности пероральный, для препаратов в виде таблеток или жестких или мягких желатиновых капсул.

Специалист в данной области знает, как определить фармакологически эффективную дозу. Такая доза может составлять от 0,0001 до 0,1 г/кг массы тела, в частности от 0,001 до 0,01 г/кг массы тела, с учетом способа введения агента, системно или локально.

В соответствии с ингибированием DUB лечение соединением по изобретению вызывает накопление полиубиквитинированных белков более высокой молекулярной массы по сравнению с лечением бортезомидом и дает более сильную реакцию на несложные белки. Согласно изобретению также обнаружено, что индукция апоптоза соединением по изобретению отличается от действия бортезомидом, будучи не чувствительной к разрушению супрессора опухолей p53 и не чувствительной к чрезмерной экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-2.

Согласно настоящему изобретению лечение соединением по изобретению ингибирует развитие опухоли на *in vivo* моделях человеческой и мышинной карциномы молочной железы, легких, толстой кишки, головы и шеи и ингибирует инфильтрацию на модели острого миелоидного лейкоза (AML). Впоследствии было раскрыто, что ингибирование активности DUB 19S RP соединением по изобретению является жизнеспособным вариантом лечения рака у людей и животных. Таким образом, более конкретно, раскрыт способ лечения у человека раковой опухоли, не восприимчивой к современной химиотерапии, включающий введение фармакологически эффективной дозы соединения по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Способ по изобретению является особенно полезным для лечения пациента, имеющего опухоль, клетки которой не восприимчивы к лечению вследствие чрезмерной экспрессии собственного ингибитора апоптоза Bcl-2.

Согласно предпочтительному аспекту изобретения 19S RP DUB включают UCHL5 и USP14. Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения соединение по изобретению не влияет на деубиквитинирующую (DUB) активность протеасомных DUB. Соединение по изобретению можно вводить в виде раствора или суспензии в жидком носителе любым подходящим способом, например посредством внутривенного, внутримышечного и подкожного введения. По-другому или дополнительно к этому, соединение по изобретению можно вводить перорально, например в виде таблетки или капсулы. Подходящая фармакологически эффективная доза соединения по изобретению составляет от 0,0001 до 0,1 г/кг массы тела, в частности от 0,001 до 0,01 г/кг массы тела, с учетом способа введения агента, системно или локально. Способ может включать выбор пациента, предполагаемого к лечению, посредством определения скорости роста рака до и после введения бортезомидом, или указанного действующего начала, участвующего в механизме бортезомидом по ингибированию деубиквитинирующей активности, или указанного другого противоракового лекарства, положительная скорость роста, в частности скорость роста более 5, или более 10, или более 25% в месяц, представляет собой маркер отбора.

Соединение по изобретению блокирует протеасомную функцию клеток, что подтверждается использованием репортерной клеточной линии, которая экспрессирует убиквитин, подвешенный к желтому флуоресцентному белку (UbG76V-YFP), конститутивно предназначенному для протеасомной деградации [12]. Иммуноблоттинг и проточная цитометрия показывают зависимость от дозы накопления репортера Ub-YFP ( $IC_{50}=0,8$  мкМ), предполагающее нарушение протеасомной функции. Так как ингибирование протеасомной функции характеризуется дефектами в убиквитиновом обороте [13], клетки HCT11 карциномы толстой кишки обрабатывают соединением по изобретению и анализируют методом имму-

ноблоттинга уровень сопряжения убиквитина. Обработка вызывает быстрое зависимое от времени накопление полиубиквитинированных белков более высокой молекулярной массы по сравнению с 20S CP ингибитором бортезомибом, предполагая, что соединение по изобретению ингибирует альтернативную ветвь УПС. Увеличение полиубиквитина связано с сильной протеотоксической реакцией, характеризующейся индукцией HSPA6 (Hsp70B'), HSPA1B и DNAJB1 (Hsp40).

Оборот многих регуляторных белков клеточного цикла регулируется УПС, включающей ингибиторы циклинзависимой киназы p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> и опухолевый супрессор p53 [4]. Обработка соединением по изобретению повышает их уровни зависимым от дозы образом, не изменяя уровни орнитиндекарбоксилазы 1 (ODC1), убиквитиннезависимого протеасомного субстрата [8]. Увеличение регуляторов клеточного цикла сопровождается задержкой роста границы фаз G2/M и увеличением содержания sub-G1 ДНК. Наблюдаемая задержка клеточного цикла не связана с повышенными уровнями маркеров повреждения ДНК, таких как фосфорилированный p53 (в положении Ser 15) [9] или H2AX (в положении Ser 139) [10], предполагая, что b-AP15 не является генотоксичным агентом.

Увеличение sub-G1 ДНК, активация каспазы-3 и расщепление поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) и цитокератина связаны с общим снижением жизнеспособности клеток при концентрациях лекарства, которые индуцируют накопление полиубиквитина, связывающего ингибирование УПС и апоптоз. Индукция апоптоза бортезомибом чувствительна к статусу супрессора опухоли p53 и чрезмерной экспрессии антиапоптотического онкопротеина Bcl-2 [11, 12]. При использовании изогенных клонов раковых клеток толстой кишки HCT116 продемонстрировано, что b-AP15-индуцированный апоптоз нечувствителен к чрезмерной экспрессии Bcl-2 и разрушению регуляторов апоптоза p52, BAX или PUMA. Измерение цитотоксической активности показывает, что соединение по изобретению является более токсичным для клеточной линии карциномы толстой кишки HTC-116, чем для иммортализованных клеток пигментного эпителия сетчатки (hTERT-RPE1) и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Соединение по изобретению демонстрирует более высокую степень цитотоксической активности по отношению к клеткам HTC-116, чем к нормальным типам клеток.

Наблюдаемое снижение активности клеточных протеасом нельзя объяснить ингибированием протеолитических активностей  $\beta$  субъединиц 20S CP. *In vitro* эксперименты с использованием активностеспецифических субстратов не показывают ингибирования ни в одной из протеолитических активностей 20S CP или 26S протеасомы, диссоциации 19S RP и 20S CP или ингибирования связывания полиубиквитина с протеасомой.

Соединение по изобретению содержит элемент  $\alpha$ - $\beta$  диенон с двумя стерически доступными  $\beta$  атомами углерода. Ранее описан структурно аналогичный фармакофор, включенный в класс ингибиторов убиквитинизопептидаз [13]. Однако, когда тестируют клеточную DUB активность, используя убиквитин 7-амидо-4-метилкумарин (Ub-AMC) на клетках, обработанных соединением по изобретению, не наблюдают снижения расщепления Ub-AMC. Это демонстрирует, что соединение по изобретению не является общим DUB-ингибитором. Без ограничения теорией, сходства в структуре фармакофора и данные, показывающие, что соединение по изобретению ингибирует активность протеасом независимо от 20S CP, указывают, что соединение по изобретению ингибирует протеасомы, блокируя деубиквитинирующую активность 19S RP.

*In vitro* исследования с использованием Ub-AMC и очищенных протеасом 19S RP или 26S подтверждают, что соединение по изобретению ингибирует деубиквитинирующую активность обеих протеасом 19S RP и 26S. Рекомбинантный убиквитин-GFP является субстратом для активности 19S RP DUB [15]. Обработка 19S RP посредством b-AP15 эффективно ингибирует расщепление Ub-GFP и убиквитинированного HDM2. Тип убиквитиновых связей, присутствующих в полиубиквитиновой цепи определяет судьбу убиквитин-модифицированного субстрата.

K48-связанные полиубиквитиновые цепи обычно нацелены на присоединенные белки для деградации [14], тогда как K63-связанные цепи вовлечены в непротеолитические роли, включая репарацию ДНК [15] и сегрегацию митотических хромосом [16]. Реакции демонтажа убиквитиновой цепи выявили, что соединение по изобретению ингибирует 19S RP обработку обоих K48 и K63 связанных убиквитиновых тетрамеров. Наблюдаемое ингибирование разборки убиквитиновой цепи может стать причиной для накопления высокомолекулярных конъюгатов убиквитина в клетках, обрабатываемых соединением по изобретению.

Деубиквитинирующую активность протеасомы приписывают действию трех DUB (UCHL5, USP14 и POH1), все они локализованы в 19S RP [17-19]. Оба UCHL5 и USP14 чувствительны к N-этилмалеимиду (NEM), общему ингибитору цистеинпротеаз, тогда как POH1 не чувствителен к ингибированию посредством NEM, но чувствителен к метал-хелатирующим агентам, таким как N,N,N,N-тетраakis-(2-пиридилметил)этилендиамин (TPEN) [20]. Эксперименты по ингибированию показывают, что остаточная активность DUB присутствует даже после совместной обработки 19S RP посредством NEM и соединения по изобретению. Эта остаточная активность DUB аннулируется после совместной обработки 19S RP соединением по изобретению и TPEN, предполагая, что соединение по изобретению сначала ингибирует один или оба NEM-чувствительных цистеиновых DUB.  $\beta$ -углероды соединения

по изобретению могут служить в качестве фрагментов акцептора Михаэля, что приводит к ковалентному связыванию с цистеиновыми остатками в целевых белках. Однако *in vitro* исследования показывают, что соединение по изобретению является обратимым ингибитором и что глутатион не препятствует ингибиторной активности соединения.

Для идентификации, какие конкретно DUB ингибируются при обработке соединением по изобретению, проводили эксперименты с конкурентным мечением, используя гемагглютинин-меченый убиквитинвинилсульфон (HA-UbVS), активный сайт-направленный зонд, который необратимо взаимодействует с DUB цистеинового класса [17]. Инкубация протеасом 19S RP или 26S с соединением по изобретению уничтожает Ub-VS маркировку двух DUB с молекулярной массой, соответствующей UCHL5 и USP14. Аналогичный результат получают с использованием UbVs на лизатах, получаемых из обработанных лекарством клеток. Иммуноблот анализ показывает сдвиг в сторону уменьшения молекулярной массы USP14 и UCHL5 вследствие потери активности и снижения UbVS мечения. Это согласуется с аффинно очищенными протеасомами из клеток, обработанных соединением по изобретению, демонстрирующими пониженную DUB активность, ограниченную протеасомами и неочевидную в лизатах клеток. Дополнительные анализы *in vitro* показывают минимальное ингибирование соединения по изобретению на рекомбинантных непротеасомных цистеиновых DUB, согласно с мнением, что ингибирование происходит не вследствие общей цистеиновой реактивности.

Соединение по изобретению действительно существенно уменьшает и даже останавливает рост опухоли *in vivo*, как показано посредством его введения мышам, несущим ксенотрансплантаты человеческой или мышинной опухоли. Если соединение по изобретению вводят ежедневно мышам SCID, несущим ксенотрансплантаты FaDu карциномы головы и шеи, то наблюдают значительное ингибирование роста опухоли FaDu после ежедневной обработки соединением по изобретению (объем опухоли обработка/контроль, T/C=0,4,  $p<0,001$ ). Некроз опухолевых клеток анализируют, измеряя производимый ксенотрансплантатом цитокератин (СК18) в циркуляции. Цитокератин-18 представляет собой биомаркер апоптоза [21, 22]; наблюдают значительное повышение уровней общего человеческого СК18 в плазме ( $p=0,01$ ). Уровни расщепляемого каспазой СК18 (СК18-Asp396) повышаются умеренно по сравнению с общими уровнями, предполагая, что соединение по изобретению обладает активностью против опухолевых клеток *in vivo*. Также показано, что соединение по изобретению ингибирует появление опухоли НСТ-116<sup>Bcl2+</sup> ксенотрансплантатов карциномы толстой кишки у голых мышей, как демонстрирует значительная задержка появления опухоли по сравнению с контролями, обработанными носителем. Аналогично соединение по изобретению ингибирует рост опухоли на моделях сингенных мышей с применением режима менее частого введения.

Убиквитин С-терминальные гидролазы (UCH) и убиквитин-специфические протеазы (USP) представляют собой основные подгруппы примерно из 100 DUB, кодируемых геномом человека [23]. Механизм специфичности соединения по изобретению для UCHL5 и USP14 в 19S RP может быть связан с уникальными конформациями этих ферментов в 19S RP или индуцированными лекарствами изменениями структуры 19S RP. Настоящие выводы согласуются с отчетами в данной области, указывающими, что потеря UCHL5 и USP14, в отличие от потери только одного, ведет к накоплению полиубиквитинированных белков и ингибированию деградации клеточных белков [24].

Особо важным представляется наблюдение, что DUB ингибирование связано с комплексами убиквитин-субстрат высокой молекулярной массы. В клетках, обработанных соединением по изобретению, наблюдают сильную экспрессию генов шаперонов, означающую индукцию протеотоксической реакции. Аккумуляция комплексов убиквитин-субстрат высокой молекулярной массы в результате ингибирования DUB соединением по изобретению, по-видимому, генерирует сильную цитотоксичность.

Далее изобретение описано более подробно со ссылкой на его предпочтительные варианты, иллюстрированные чертежами, включающими ряд фигур.

#### Описание чертежей

На фиг. 1a-1o представлены диаграммы, иллюстрирующие дозозависимую индукцию цитотоксичности через 72 ч непрерывного воздействия на репортерную линию клеток НСТ-116 вариантами соединения по изобретению по измерениям FMCA (флуориметрический анализ цитотоксичности в микрокультурах), а также отсутствие такой индукции при использовании структурно родственных соединений, не входящих в изобретение. Обработанные клетки сравнивают с необработанными контролями (коэффициент выживания).

На фиг. 2a-2e представлены диаграммы, иллюстрирующие превосходную растворимость соединений по изобретению в водной среде при физиологическом pH.

На фиг. 3a-3f представлены диаграммы, иллюстрирующие по методу фиг. 1a-1o превосходную цитотоксичность азапановых соединений по изобретению относительно структурно соответствующих пиперидин-4-оновых соединений, не входящих в изобретение.

### Описание предпочтительных вариантов

#### Методы.

In vitro анализ активности протеасом выполняют на черном микротитровальном 96-ячеечном планшете, используя человеческие 20S протеасомы (Boston Biochem) в реакционном буфере (25 mM Hepes, 0,5 mM EDTA, 0,03% SDS) с применением Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC или Boc-LRR-AMC в качестве субстратов для активности протеасом. Анализы деубиквитиназной активности выполняют, используя человеческий 19S RP (Boston Biochem) с убиквитином AMC в качестве субстрата. Для исследований ксенотрансплантата FaDu 100-мкл-клеточную суспензию, содержащую  $1 \times 10^6$  клеток, вводят подкожно в бок мышам SCID. После внесения опухоли мышей рандомизируют на контрольную или обрабатываемую группы и вводят 5 мг/кг соединения по изобретению или наполнителя. Определяют in vivo уровни апоптоза и некроза клеток посредством детектирования расщепляемых каспазой и общих уровней цитокератина-18 в плазме, применяя исследования M30 Apoptosense® и M65 ELISA® (Peviva). Методы описаны ниже более подробно.

#### Реагенты.

Реагенты получают из следующих источников:

протеасомы 20S (E-360), протеасомы 26S (E-365), протеасомы 19S (E-366), Suc-LLVY-AMC (S-280), Z-LLE-AMC (S-230), Boc-LRR-AMC (S-300), убиквитин-AMC (U-550), тетраубиквитин K63 (UC-310), тетраубиквитин 48 (UC-210), набор деконъюгирующих ферментов (KE10), HA-убиквитинвинилсульфон (U-212) (Boston Biochem);

анти-β-актин (AC-15), ODC-1 (HPA001536) (Sigma Aldrich);

анти-ЖХ-3 (2775), анти-GAPDH (2118), анти-p44/42 MAPK (4695), анти фосфо-p44/42 MAPK (9101) ((Cell Signaling));

N-этилmaleимид (34115) (EMD Chemicals);

анти-убиквитин K48 (Apu2), анти-убиквитин (MAB1510) (Millipore);

анти-p53 (DO1), анти-UCHL5 (H-110), Hdm2 (SMP14) (Santa Cruz);

анти-PARP (C2-10), анти-p27 (G173-524), анти-активная каспаза-3 (C92-605) (BD Biosciences);

анти-USP14 (A300-919A) (Bethyl Laboratories);

анти-HA (12CA5) (Roche).

Бортезомиб получают от Department of Oncology, Karolinska Hospital, Sweden.

Клеточные культуры.

Клетки MCF7 содержат в минимальной питательной среде MEM/с 10% фетальной телячьей сывороткой. Клетки HCT-116 p53+/+, p53-/-, Bcl-2+/+, PUMA-/- и BAX-/- содержат в модифицированной среде Маккая/с 10% фетальной телячьей сывороткой. Клетки HCT-116 p53+/+, p53-/-, PUMA-/- и BAX-/- генерируют, как описано в [25]. HCT-116 Bcl-2+/+ клеточную линию генерируют, трансфицируя исходные клетки HCT-116 p53+/+ посредством pCEP4 Bcl-2 (Addgene плазида 16461) [26] и выделяя клоны с высокой экспрессией. Клетки FaDu и LLC3 содержат в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, Na-пируватом, Hepes и незначительными аминокислотами. Клетки карциномы 4T1, 12b содержат в среде RPMI, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой. Протеасомные репортерные линии клеток MelJuSo Ub-YFP генерируют, как описано в [12]). Клетки содержат в среде Игла, модифицированной Дульбекко с 10% фетальной телячьей сывороткой. Клеточную линию эпителия сетчатки генерируют, как описано в [12]). Все клетки содержат в среде Игла, модифицированной Дульбекко с 10% фетальной телячьей сывороткой. Линии сетчатки эпителиальных клеток генерируют, как описано в [28]. Все клетки содержат при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Исследования ингибирования протеасом и DUB.

In vitro исследования активности протеасом с использованием 20S CP (2 nM) (Boston Biochem) проводят при 37°C в 100 мкл реакционного буфера (25 mM Hepes, 0,5 mM EDTA, 0,03% SDS). Образцы инкубируют в течение 10 мин с указанным соединением, а затем добавляют 10 мкМ Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC или Boc-LRR-AMC для детектирования химотрипсин-подобной, каспаза-подобной и трипсин-подобной активности соответственно. Для исследований ингибирования DUB инкубируют 19S RP (5 nM), 26S (5 nM) UCH-L1 (5 nM), UCH-L3 (0,3 nM), USP2CD (5 nM), USP7CD (5 nM), USP8CD (5 nM) и BAP1 (5 nM) с соединением по изобретению, а затем добавляют убиквитин-AMC (1000 nM). Флуоресценцию контролируют, используя счетчики Wallac Multilabel или Tecan Infinite M1000, оснащенные возбуждающими 360 нм и эмиссионными 460 нм фильтрами.

Исследования с наложением субстрата.

Нативный гель-электрофорез выполняют, как описано в [29]. Кратко говоря, 4 мкг очищенных протеасом 26S (Boston Biochem) смешивают с 10 или 50 мкМ соединения по изобретению и инкубируют при 37°C в течение 10 мин. Образцы разделяют в 4% неденатурирующем PAGE. Гели погружают в исследовательский буфер (20 mM трис-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM АТФ, 0,1 mM Suc-LLVY-AMC) и визуализируют протеасомы при УФ-освещении.

Исследование расщепления убиквитином.

Рекомбинантную Ub-GFP плазмиду pet19b Ub-M-GFP генерируют, как описано в [30]. Кратко говоря, рекомбинантную Ub-GFP очищают от клеток BL21 E.coli посредством His-аффинного очищения. Для исследований расщепления 19S RP (25 нМ) инкубируют с 10 мМ NEM, 250 мкМ TPEN или 50 мкМ соединения по изобретению в течение 10 мин с последующим добавлением рекомбинантных Ub-GFP (200 нМ). Реакции разборки убиквитиновой цепи выполняют, по существу, как описано выше, за исключением того, что Ub-GFP заменяют K48- или K63-связанными убиквитиновыми тетрамерами (50 нг). Уровень Ub-GFP расщепления или убиквитиновой разборки определяют методом иммуноблоттинга с антиубиквитиновыми антителами.

Убиквитинированный Hdm2 субстрат генерируют согласно протоколу Boston Biochem (K-200). Для исследования расщепления 19S RP (25 нМ) инкубируют с 50 мкМ соединения по изобретению или ДМСО в течение 10 мин с последующим добавлением убиквитинированного Hdm2 субстрата (100 нМ). Расщепление убиквитинированного Hdm2 субстрата и убиквитинированного Hdm2 определяют методом иммуноблоттинга с анти-Hdm2 антителами.

Выделение протеасом: клетки НСТ-116 обрабатывают бортезомибом (100 нМ) или соединением по изобретению (1 мкМ) в течение 3 ч. После стимуляции клетки лизируют в 50 мМ HEPES, pH 7,4, 250 мМ сахара, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ, 1 мМ DTT и 0,025% дигитонин. На образцы кратко воздействуют ультразвуком и инкубируют в течение 15 мин на льду. Протеасомы из этих образцов выделяют согласно протоколу производителя.

UbVS-мечение DUB.

Для мечения DUB в лизатах клеток собирают субконфлюэнтные клетки трипсинизацией, промывают три раза PBS и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин. Гранулы клеток лизируют буфером (50 мМ HEPES, pH 7,4, 250 мМ сахара, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ, 1 мМ DTT) на льду в течение 15 мин. Остатки удаляют центрифугированием и 25 мкг белка метят посредством 1 мкМ HA-UbVS в течение 30 мин при 37°C. Образцы разделяют методом SDS-PAGE и анализируют методом иммуноблоттинга с указанными антителами.

Определение апоптоза и жизнеспособности клеток.

Для определения апоптоза исходные клетки НСТ-116 p53+/+ обрабатывают возрастающими дозами соединения по изобретению в течение 24 ч. Применяемые для обработки дозы основаны на концентрации лекарства, которая дает максимальный апоптоз через 24 ч. Клетки НСТ-116 высевает на 96-ячеечные микротитровальные планшеты при плотности 10000 клеток/ячейку и инкубируют в течение ночи. Клетки обрабатывают указанным лекарственным препаратом в течение 24 ч. В конце инкубационного периода добавляют к среде для культивирования ткани NP40 до 0,1% и исследуют 25 мкл содержимого из каждой ячейки, применяя M30-Apoptosense® ELISA, как описано ранее [31]. Жизнеспособность клеток определяют, измеряя кислотную фосфатазную активность или применяя метод FMCA [32]. Для определения кислотной фосфатазной активности клетки высевает на 96-ячеечные планшеты для культивирования с плотностью 5000 клеток/ячейку и инкубируют в течение 12 ч при 37°C. К клеткам в питательной среде добавляют соединения и инкубируют в течение 72 ч при 37°C. Клетки промывают 200 мкл теплого PBS. Добавляют 100 мкл паранитрофенилфосфата (pNPP, 2 мг/мл) в Na-ацетатном буфере с pH 5 (NaAc 0,1 М, 0,1% Triton-X-100) на ячейку. Клетки инкубируют в течение 2 ч, после чего реакцию останавливают, добавляя 1н. NaOH. Измеряют поглощение при 405 нм. На фиг. 1a-1o показана дозозависимая цитотоксичность для ряда вариантов соединения по изобретению.

Для FMCA исследования клетки высевает на 384-ячеечные планшеты, подготовленные с использованием, применяя дозировочный робот Precision 2000 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT). Планшеты инкубируют в течение 72 ч и затем переносят на комплексную систему HTS SAIGAN Core System, включающую робот ORCA (Beckman Coulter) с CO<sub>2</sub>-инкубатором (Cytomat 2C, Kendro, Sollentuna, Sweden), диспенсерный модуль (Multidrop 384, Titertek, Huntsville, AL), промывочный модуль (ELx 405, Bio-Tek Instruments Inc), станцию для извлечения, места для размещения планшетов, считыватель штрихкодов (Beckman Coulter), устройство подачи жидкостей (Biomek 2000, Beckman Coulter) и многоцелевой ридер (FLUOstar Optima, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany) для автоматизированного анализа FMCA. Коэффициент выживания (SI) определяют как флуоресценцию тестируемых ячеек в процентах от контролей при вычете контрольных значений.

Анализ клеточного цикла.

Для определения клеточного цикла клетки НСТ-116 обрабатывают соединением по изобретению или ДМСО, собирают клетки трипсинизацией, промывают и фиксируют в охлажденном на льду 70% EtOH в течение 12 ч. Клетки повторно суспендируют в окрашивающем растворе, содержащем пропидий йодид (50 мкг/мл) и РНКазу (0,5 мкг/мл) в PBS. Образцы исследуют на BD FACScalibur. Определяют процент клеток на каждой фазе клеточного цикла, используя программное обеспечение Mod Fit.

Пример 1. Типичный синтез предпочтительных вариантов соединения по изобретению.

Общая информация.

Все используемые растворители имеют ВЭЖХ-класс чистоты или выше. Когда требуются безводные условия, для обеспечения сухости добавляют в растворитель избыток 3 Å молекулярных сит по меньшей мере за 24 ч до использования. Спектры ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  ЯМР) регистрируют на спектрометре Bruker Advance DPX 400 при 400,1 МГц. Масс-спектры низкого разрешения при ионизации электрораспылением получают, используя масс-спектрометр Agilent в режиме положительной ионизации. Флэш-хроматографию выполняют на Merck силикагеле 60 (230-400 меш). Аналитические ЖХ-МС данные получают на масс-спектрометре Agilent; система Agilent 1100; А: колонка ACE C8 (50×3,0 мм, 5 мкм), градиент: 10-97% ацетонитрил в смеси вода/0,1% ТФУ, за 3 мин 1,0 мл/мин или В: колонка xBridge C18 (50×3,0 мм, 3,5 мкм), градиент ацетонитрил от 10 до 97% в 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 10) за 3 мин, 1 мл/мин). Названия химических структур определяют, используя Marvin Seech 5.2.6, ChemAxon.

(3E,5E)-3,5-бис-(Фенилметилен)азепан-4-он (№ 1516) и

(3E,5E)-3,5-бис-(4-метоксифенилметилен)азепан-4-он (№ 1517).

Гексагидро-4Н-азепин-4-он (0,45 г, 3,0 ммоль) вместе с бензальдегидом (0,70 г, 7,0 ммоль), 4-метоксибензальдегидом (0,90 г, 7,0 ммоль) или 4-хлорбензальдегидом (0,92 г, 7,0 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (10 мл). Затем добавляют по капле серную кислоту (конц. 1 мл) и реакционную смесь перемешивают в течение 24 ч при к.т. Добавляют воду (30 мл) и осадок отфильтровывают и сушат в вакууме в течение ночи. Дополнительную очистку не проводят. Соединение № 1516 получают с 99% степенью чистоты, определяемой методом ЖХ-МС (система А).

MS ESI<sup>+</sup> m/z 290 [M+H].

Соединение № 1517 также получают с 99% степенью чистоты, методом ЖХ-МС (система А), MS EST m/z 350 [M+H]<sup>+</sup>.

Соединение № 1518 получают с 91% степенью чистоты; ЖХ-МС (система А), MS EST m/z 358 [M]<sup>+</sup>, 360 [M+2]<sup>+</sup>.

(3E,5E)-3,5-бис-(Фенилметилен)-1-(проп-2-еноил)азепан-4-он (№ 1520).

(3E,5E)-3,5-бис-(Фенилметилен)азепан-4-он (№ 1516) (50,0 мг, 0,182 ммоль) и акриловую кислоту (14,4 мг, 0,20 ммоль), НВТУ (58,4 мг, 0,182 ммоль), триэтиламин (36,7 мг, 0,364 ммоль) растворяют в ДМФА (2 мл) и перемешивают в течение ночи. Добавляют этилацетат и насыщенный раствор соли и продукты экстрагируют. Объединенные органические слои сушат и выпаривают. Сырой продукт разводят метанолом и очищают методом препаративной ВЭЖХ. Соединение № 1520 получают с 96% степенью чистоты.

MS-ESI<sup>+</sup> m/z 344 [M+H]<sup>+</sup>.

(2R)-[(3E,5E)-3,5-бис-(4-Нитрофенилметилен)-4-оксо-1-(пирролидин-2-илкарбонил)азепан трифторацетат (№ 1505).

N-Вос-азепанон (100 мг, 0,47 ммоль) и 4-нитробензальдегид (156 мг, 1,03 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (10 мл). Затем добавляют по капле серную кислоту (конц. 1 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение трех дней. Далее добавляют еще альдегид и серную кислоту и реакционную смесь перемешивают еще 24 ч, еще дважды добавляют кислоту с интервалом 24 ч. Реакционную смесь гасят, добавляют воду и выпавшие в осадок сырые промежуточные продукты отфильтровывают и промывают водой. После сушки продукта в вакууме в течение ночи отвешивают 2×35 мг (0,09 ммоль) сырого промежуточного продукта в две колбы и растворяют вместе с моноэтилсукцинатом (14,8 мг, 0,10 ммоль) в смеси ДХМ/ДМФА (2 мл, 4:1). Добавляют триэтиламин (19,3 мкл, 0,14 ммоль) и смесь перемешивают 5 мин. перед введением НАТУ (38,6 мг, 0,10 ммоль). После перемешивания в течение 12 ч добавляют еще триэтиламин и НАТУ и продолжают перемешивание в течение 4 ч. Растворители выпаривают и остаток очищают методом препаративной ВЭЖХ. Растворяют остаток в смеси дихлорметан/трифторуксусная кислота (5 мл, 4:1), перемешивают 40 мин и снова концентрируют. Соединение № 1505 получают с 93% степенью чистоты по данным ЖХ-МС (система А).

MS ESI<sup>+</sup> m/z 477 [M+H]<sup>+</sup>.

Пример 2. Дополнительные типичные примеры синтеза предпочтительных вариантов соединения по изобретению.

(2R)-2-[(3E,5E)-3,5-бис-[(4-Нитрофенил)метилен]-4-оксоазепан-1-карбонил} пирролидиний трифторацетат (соединение № 1505).

N-Вос-азепан-4-он (0,10 г, 0,47 ммоль) и 4-нитробензальдегид (156 мг, 1,0 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (10 мл), добавляют по капле конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение выходных. Добавляют еще альдегид (156 мг) и  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 мл) и продолжают перемешивание при к.т. в течение ночи. Добавляют еще конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и реакционную смесь снова перемешивают в течение ночи. Добавляют еще конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и реакционную смесь перемешивают до завершения взаимодействия (две недели). После добавления воды образуется коричневый осадок, его отфильтровывают, промывают водой и сушат в вакууме, получая 339,5 мг коричневого твердого промежуточного продукта 1, ко-

торый используют без дополнительной очистки. Промежуточный продукт 1 (35 мг, 0,09 ммоль) и N-вос-пролин (22 мг, 0,10 ммоль) растворяют в смеси ДХМ/ДМФА (4:1, 2 мл). Добавляют ТЭА (19 мкл, 0,14 ммоль) и смесь перемешивают в течение 5 мин, затем добавляют НАТУ (38,6 мг, 0,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют еще ТЭА (19 мкл, 0,14 ммоль) и НАТУ (38,6 мг, 0,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивают еще 4 ч. Реакционную смесь концентрируют и затем очищают методом препаративной ЖХ (40-70% АСН в 0,1% ТФУ), получая продукт в виде желтого твердого вещества. Твердое вещество растворяют в смеси ДХМ/ТФУ (4:1, 5 мл) и раствор перемешивают при к.т. 40 мин для удаления защитной группы вос. ТФУ-соль продукта выделяют в виде желтого твердого вещества 93% степени чистоты.

ЖХ-МС А: Rt 1,94/1,99, m/z [M+H]<sup>+</sup> 477,1; В: Rt 2,28.

(3Е,5Е)-1-(4-Этоксид-4-оксобутаноил)-3,5-бис-[(4-нитрофенил)метилен]-4-оксоазепан-1-ий трифторацетат (соединение № 1507).

Промежуточный продукт 1 (35 мг, 0,09 ммоль) и N-вос-пролин (22 мг, 0,10 ммоль) растворяют в смеси ДХМ/ДМФА (4:1, 2 мл). Добавляют ТЭА (19 мкл, 0,14 ммоль) и смесь перемешивают в течение 5 мин, затем добавляют НАТУ (38,6 мг, 0,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют еще ТЭА (19 мкл, 0,14 ммоль) и НАТУ (38,6 мг, 0,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивают еще 4 ч. Реакционную смесь концентрируют и затем очищают методом препаративной ЖХ (40-70% АСН в 0,1% ТФУ), получая ТФУ-соль продукта в виде желтого твердого вещества с 95% степенью чистоты.

ЖХ-МС А: Rt 2,48/2,50, m/z [M+H]<sup>+</sup> 508,1; В: Rt 2,48/2,52.

(3Е,5Е)-3,5-бис-[(4-Хлорофенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1518).

Азепан-4-он гидрохлорид (0,45 г, 3,0 ммоль) и 4-хлорбензальдегид (0,92 г, 6,6 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (10 мл), добавляют по капле конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 24 ч. После добавления воды (30 мл) образуется осадок, его отфильтровывают и сушат в вакууме, получая продукт с 91% степенью чистоты в виде желтого твердого вещества.

ЖХ-МС А: Rt 2,04, m/z [M]<sup>+</sup> 358,1.

(3Е,5Е)-3,5-бис-(Фенилметилен)-1-(проп-2-еноил)азепан-4-он (соединение № 1520).

Азепан-4-он гидрохлорид (50 мг, 0,182 ммоль), акриловую кислоту (14 мкл, 0,20 ммоль), ТВТУ (58 мг, 0,182 ммоль) и ТЭА (37 мг, 0,364 ммоль) растворяют в ДМФА (2 мл) и перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют насыщенный раствор соли и этилацетат и фазы разделяют. Сушат органическую фазу и растворители выпаривают после фильтрования. Сырой продукт растворяют в уксусной кислоте (2 мл) и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 мл). Добавляют бензальдегид (50 мкл) и реакционную смесь перемешивают в течение 24 ч. Добавляют метанол и воду к смеси, которую очищают методом препаративной ЖХ. Указанное в заголовке соединение выделяют в виде желтого твердого вещества с 96% степенью чистоты.

ЖХ-МС А: Rt 2,68, m/z [M+H]<sup>+</sup> 344,1.

(3Е,5Е)-3,5-бис-(Фенилметилен)-1-циклобутанкарбонилазепан-4-он (соединение № 1521).

Азепан-4-он гидрохлорид (50 мг, 0,182 ммоль), цикломасляную кислоту (14 мкл, 0,20 ммоль), ТВТУ (58 мг, 0,182 ммоль) и ТЭА (37 мг, 0,364 ммоль) растворяют в ДМФА (2 мл) и перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют насыщенный раствор соли и этилацетат и фазы разделяют. Сушат органическую фазу и растворители выпаривают после фильтрования. Сырой продукт растворяют в уксусной кислоте (2 мл) и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 мл). Добавляют бензальдегид (50 мкл) и реакционную смесь перемешивают в течение 24 ч. Добавляют метанол и воду к смеси, которую очищают методом препаративной ЖХ. Указанное в заголовке соединение выделяют в виде желтого твердого вещества с 96% степенью чистоты.

ЖХ-МС А: Rt 2,68, m/z [M+H]<sup>+</sup> 372,1.

(3Е,5Е)-1-(2-Циклопропилацетил)-3,5-бис-[(4-метоксифенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1526)

Азепан-4-он гидрохлорид (0,45 г, 3,0 ммоль) и 4-метоксibenзальдегид (0,90 г, 6,6 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (10 мл), добавляют по капле конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 24 ч. Добавляют воду (30 мл). Осадок отфильтровывают и сушат в вакууме в течение ночи. Сырой материал (30 мг, 0,107 ммоль), циклопропилуксусную кислоту (12 мг, 0,12 ммоль), ТЭА (26 мг, 0,26 ммоль) и ТВТУ (41 мг, 0,13 ммоль) растворяют в ДМФА (2 мл) и перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют метанол (1,5 мл) и воду (0,5 мл) и очищают продукт методом препаративной ЖХ, получая твердый продукт с 95% степенью чистоты.

ЖХ-МС А: Rt 2,51, m/z [M+H]<sup>+</sup> 432,2.

(3Е,5Е)-5-[(3-Нитрофенил)метилен]-3-(фенилметилен)азепан-4-он (соединение № 1560).

N-Вос-азепан-4-он (0,10 г, 0,47 ммоль) и 3-нитробензальдегид (156 мг, 1,0 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (5 мл), добавляют по капле концентрированную H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 мл) и перемешивают реакционную смесь при к.т. в течение 4 дней. Затем добавляют еще концентрированную H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 мл) и альдегид (156 мг, 1,0 ммоль) и продолжают перемешивание при к.т. в течение трех недель. Получают смесь продуктов моно- и диконденсации. Смесь очищают методом колоночной хроматографии (ДХМ/метанол), получая промежуточный амин, промежуточный продукт 2, в виде коричневого масла (19 мг). Промежуточный продукт 2 растворяют в уксусной кислоте (1,5 мл) вместе с бензальдегидом.

Добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,05 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение ночи. Затем добавляют еще  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и продолжают перемешивание в течение недели. Добавляют еще альдегид (156 мг, 1,0 ммоль) и  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и продолжают перемешивание еще 4 дня. Реакционную смесь концентрируют и очищают методом препаративной ЖХ, получая ТФУ-соль продукта в виде желтого твердого вещества с 98% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А:  $R_t$  1,78,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  335,1; система В:  $R_t$  2,43/2,28.

(3Е,5Е)-1-Метил-3,5-бис-[(4-нитрофенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1563).

N-Метилазепан-4-он-НCl (50 мг, 0,30 ммоль) и 4-нитробензальдегид растворяют в уксусной кислоте (5 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 мкл) и смесь перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют еще концентрированную  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100 мкл) и продолжают перемешивание при к.т. в течение 6 ч. Добавляют еще 500 мкл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и реакционную смесь перемешивают в течение ночи. Добавляют еще 350 мкл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и продолжают перемешивание еще 5 ч, в течение которых добавляют еще  $\text{H}_2\text{SO}_4$  двумя порциями (500 мкл и 250 мкл). Затем добавляют воду (3 реакционных объема) и смесь перемешивают до достижения комнатной температуры. Реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (3 реакционных объема). Фазы разделяют и органическую фазу концентрируют, получая темно-желтое вязкое масло. Сырой продукт очищают методом препаративной ВЭЖХ (колонок XBridge; элюенты 50 mM аммоний-карбонатный буфер с pH 10 и метанол), получая указанный в заголовке продукт в виде желтого твердого вещества (26,3 мг).

ЖХ-МС система А:  $R_t$  1,87,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  394,1; система В:  $R_t$  2,57.

(3Е,5Е)-3,5-бис-[(4-Фторфенил)метилен]-1-пропилазепан-4-он (соединение № 1574).

Азепан-4-он гидрохлорид (0,25 г, 1,68 ммоль) и 4-фторбензальдегид (0,416 г, 3,36 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (20 мл) и раствор перемешивают в течение 10 мин, затем медленно добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (200 мкл) и раствор перемешивают при к.т. в течение ночи. Добавляют еще конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 мл) и перемешивание продолжают при к.т. Через 6 ч добавляют еще конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и реакционную смесь снова перемешивают в течение ночи. На следующий день добавляют еще 800 мкл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и продолжают перемешивание пять дней, в течение которых добавляют к реакционной смеси две порции  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 и 0,5 мл). Затем добавляют воду (3 реакционных объема) и смесь перемешивают до достижения комнатной температуры. Реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (10 реакционных объемов).

Органическую фазу концентрируют выпариванием. Добавляют к остатку воду. Образуется осадок, его отфильтровывают. Твердое вещество промывают водой и сушат в вакууме, получая промежуточный продукт 3 в виде желтого твердого вещества. Часть его (15 мг, 0,05 ммоль) растворяют в ДХЭ, добавляют пропанал (4 мкл, 0,06 ммоль) и смесь перемешивают в течение 15 мин при к.т. Затем добавляют  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (15,7 мг, 0,07 ммоль) и уксусную кислоту (2,6 мкл, 0,05 ммоль) и перемешивают реакционную смесь при к.т. в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют и очищают сырой продукт методом препаративной ЖХ, получая продукт (7,2 мг) с 90% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А:  $R_t$  2,02,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  368,1, система В:  $R_t$  3,21.

(3Е,5Е)-3-[(4-Метоксифенил)метилен]-5-[(4-нитрофенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1575).

Азепан-4-он гидрохлорид (0,25 г, 1,68 ммоль) и 4-нитробензальдегид (253 мг, 1,68 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (20 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 мл) и смесь перемешивают при к.т. в течение 8 дней. В дни 1-3 добавляют одну порцию конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в день (0,5 мл, 0,75 мл и 0,5 мл). Добавляют воду (2 реакционных объема) и смесь экстрагируют этилацетатом (2 реакционных объема). Органическую фазу концентрируют выпариванием и сушат, получая сырой промежуточный продукт 4. Часть промежуточного продукта 4 (100 мг, 0,41 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (6 мл) и перемешивают 10 мин, а затем медленно добавляют концентрированную  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,6 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 6 дней. После добавления воды продукт осаждается в виде желтого твердого вещества. Осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде желтого твердого вещества с 98% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А:  $R_t$  1,82,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  365,1; система В:  $R_t$  2,41.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ) [м.д.] = 2,97-2,99 (м, 2H), 3,41-3,44 (м, 2H), 3,83 (ш.с, 3H), 4,28 (с, 2H), 7,06-7,08 (д, 2H), 7,47 (с, 1H), 7,59-7,62 (д, 2H), 7,76 (с, 1H), 7,78-7,80 (д, 2H), 8,27-8,29 (д, 2H).

(3Е,5Е)-5-[(4-Фторфенил)метилен]-3-[(4-метоксифенил)метилен]-1-метилазепан-4-он (соединение № 1577).

N-Метилазепан-4-он гидрохлорид (75 мг, 0,46 ммоль) и 4-фторбензальдегид растворяют в уксусной кислоте (7 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (350 мкл) и смесь перемешивают при к.т. в течение 8 дней. В течение дней 2-4 добавляют еще конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,175, 0,35, 0,25 мл соответственно). Добавляют воду и раствор экстрагируют этилацетатом (двойной объем реакционной смеси). Органическую фазу концентрируют, получая промежуточный продукт 5. Часть этого промежуточного продукта (35 мг, 0,15 ммоль) и 4-метоксibenзальдегид (17 мкл, 0,15 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (2,5 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,20 мл) и реакционную смесь перемешивают в течение пяти дней. Добавляют воду (2 реакционных объема) и реакци-

онную смесь экстрагируют этилацетатом (2 реакционных объема). Органический слой концентрируют и добавляют воду. Образуется осадок, его отфильтровывают, получая указанный в заголовке продукт (11,2 мг) в виде желтого твердого вещества с 91% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А: Rt 1,86, m/z [M+H]<sup>+</sup> 352,1; система В: Rt 2,79.

(3Е,5Е)-1-Ацетил-5-[(4-фторфенил)метилен]-3-[(4-этоксифенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1579).

Азепан-4-он гидрохлорид (0,25 г, 1,68 ммоль) и 4-фторбензальдегид (179 мкл, 1,68 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (20 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 мл) и смесь перемешивают при к.т. в течение 8 дней с добавлением конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение первых трех дней (0,5, 0,75 и 0,5 мл соответственно). Добавляют воду (2 реакционных объема) и смесь экстрагируют этилацетатом (2 объема смеси). Органическую фазу концентрируют и сушат, получая сырой промежуточный продукт 6. Часть этого промежуточного продукта (100 мг, 0,46 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (6 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют концентрированную H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 7 дней. Добавляют воду (1 объем) и смесь нейтрализуют насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат в вакууме, получая промежуточный продукт 7 (31,5 мг) в виде желтого твердого вещества с 91% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А: Rt 1,85, m/z [M+H]<sup>+</sup> 338.

Промежуточный продукт 7 (10 мг) растворяют в ДХМ (1 мл) и добавляют ТЭА (5,0 мкл, 0,04 ммоль). Смесь перемешивают 10 мин, а затем добавляют ацетилхлорид (2,3 мкл, 0,03 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 30 мин. Реакционную смесь промывают водой, насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют, получая указанное в заголовке соединение (6,4 мг) в виде желтого твердого вещества с 90% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А: 2,35 Rt, m/z [M+H]<sup>+</sup> 380,1; система В: Rt 2,37.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): [м.д.] = 1,70, 1,90, 1,98 и 1,99 (4×с, 3H, CH<sub>3</sub>CO-, сигналы от двух региоизомеров и ротамеров их ацетата), 2,89-3,01 (м, 2H), 3,68-3,77 (м, 2H), 3,79, 3,79, 3,79, 3,08 (4×с, 3H, -ОМе, сигналы от двух региоизомеров и ротамеров их ацетата), 4,65-4,68 (м, 2H), 7,0-7,04 и 7,098-7,103 (2×м, 2H), 7,22-7,30 (м, 3H), 7,48-7,62 (м, 5H).

(3Е,5Е)-5-[(4-Хлорофенил)метилен]-3-[(4-нитрофенил)метилен]азепан-4-он (соединение № 1583).

N-Метилазепан-4-он гидрохлорид (75 мг, 0,46 ммоль) и 4-хлорбензальдегид (64 мг, 0,46 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (7 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (350 мкл) и смесь перемешивают при к.т. в течение 8 дней. Добавляют еще конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение дней 2-4 (0,175, 0,35, 0,25 мл соответственно). Добавляют воду (2 реакционных объема) и раствор экстрагируют этилацетатом (2 реакционных объема). Органическую фазу концентрируют, получая промежуточный продукт 8. Часть этого промежуточного продукта (35 мг, 0,14 ммоль) и 4-нитробензальдегид (69,5 мг, 0,46 ммоль) растворяют в уксусной кислоте (2,5 мл) и перемешивают 10 мин, затем медленно добавляют конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 мкл) и смесь перемешивают при к.т. в течение 5 дней. Добавляют еще конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 мл) и продолжают перемешивание еще 5 дней. Добавляют воду (2 реакционных объема) и раствор экстрагируют этилацетатом (2 реакционных объема). Органическую фазу концентрируют и остаток очищают методом препаративной ЖХ, получая указанное в заголовке соединение (1,8 мг) в виде желтого твердого вещества с 94% степенью чистоты.

ЖХ-МС система А: Rt 1,98/2,04, m/z [M+H]<sup>+</sup> 383,1, система В: Rt 2,82/2,98.

Сокращения:

Вос - трет-бутилоксикарбонил;

АСН - ацетонитрил;

ДХМ - дихлорметан;

ТФУ - трифторукусная кислота;

ДМФА - диметилформамид;

ТЭА - триэтиламин;

Rt - время удерживания;

TBTU - O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий тетрафторборат;

к.т. - комнатная температура;

ЖХ - жидкостная хроматография;

ЭДК - 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид;

НАТУ - 2-(1Н-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметил-гексафторфосфат;

ДХЭ - 1,2-дихлорэтан.

Пример 3. Фармацевтическая композиция (водная суспензия).

Соединение по изобретению (25 мг) растворяют в 1 мл диметилсульфоксида. Данный раствор добавляют по капле к 10 мл энергично перемешиваемого физиологического раствора. Полученную суспензию, которую можно стабилизировать посредством добавления 1 мас.% PVP, можно применять для

внутримышечного, внутривенного или подкожного введения.

Пример 4. Фармацевтическая композиция В (таблетки).

Таблетки для перорального приема получают, смешивая 2,0 г соединения по изобретению (порошок, <10 мкм, 90%) с микрокристаллической целлюлозой (1,30 г), кукурузным крахмалом (0,50 г), диоксидом кремния (0,20 г), стеаратом Mg (0,12 мг). Смесь прессуют сухим способом, получая 400 мг таблетки, которые покрывают сахаром.

Пример 5. Фармацевтическая композиция С (раствор).

Соединение по изобретению (10 мг) растворяют в 0,5 мл кремофора EL (BASF Corp.) и добавляют абсолютный этанол до 1,0 мл. Прозрачным раствором заполняют стеклянные ампулы для инъекций.

Пример 6. Фармацевтическая композиция D (раствор).

Для внутрибрюшинного введения при исследованиях на животных готовят водную композицию - исходный раствор, растворяя соединение по изобретению до концентрации 2 мг/мл в смеси кремофор EL/полиэтиленгликоль 400 = 1:1. (об./об.) при к.т. или при нагревании до температуры примерно 80°C и вспомогательном воздействии ультразвуком. Аликвоту исходного раствора разбавляют 1:10 0,9% физиологическим раствором и сразу же используют для внутрибрюшинной инъекции.

Пример 7. Фармацевтическая композиция E (раствор).

Для внутрибрюшинного введения готовят 25 мас.% исходный раствор Kolliphor HS15 посредством плавления целого контейнера Kolliphor HS15 (Sigma 42966) при нагревании до 60°C и разбавления деионизированной водой до 25% мас./мас. К соединению № 1570 (18,0 мг) в 10 мл пробирке для образца добавляют 10,0 мл исходного раствора, пробирку встряхивают, обрабатывают ультразвуком при температуре около 50°C в течение примерно 2 ч и время от времени нагревают до 83°C. Полученный прозрачный раствор перед инъекцией подвергают стерилизующему фильтрованию, используя 0,2 мкм целлюлозный шприцевой фильтр. По аналогичной методике готовят растворы соединений № 1546 и 1571; однако эти соединения растворяются не полностью. Нерастворенный остаток взвешивают и данную массу вычитают из начальной массы соединения (18 мг). Обнаружено, что приготовленные растворы (10 мл) содержат 8,5 и 11,0 мг соединений № 1546 и 1571 соответственно.

Пример 8. Фармацевтическая композиция F (раствор).

Для внутрибрюшинного введения готовят исходный раствор 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина (Aldrich 332593), растворяя циклодекстрин в деионизированной воде до концентрации 30% мас./мас. К соединению № 1649 (15,0 мг) в 10 мл пробирке для образца добавляют 10,0 мл исходного раствора. Пробирку встряхивают, обрабатывают ультразвуком при температуре около 50°C в течение примерно 2 ч и время от времени нагревают до 83°C. Полученный раствор перед инъекцией подвергают стерилизующему фильтрованию, используя 0,2 мкм целлюлозный шприцевой фильтр. Определяют массу оставшегося нерастворенного соединения № 1659 и используют ее для коррекции концентрации фильтрованного раствора до 82,5% от получаемой концентрации. По той же методике готовят раствор соединения № 1546.

Пример 9. Соединение по изобретению индуцирует ингибирование протеасом.

Для оценки соединения используют репортерную клеточную линию MelJuSo Ub-YFP, которая спроектирована для аккумуляции желтого флуоресцентного белка (YFP) после ингибирования протеасом (12). Аккумуляцию YFP измеряют в течение 48 ч на системе IncuCyte-FLR (Essen Bioscience, Essen, UK), которая представляет собой автоматический флуоресцентный микроскоп. В качестве меры ингибирования протеасом используют количество положительных клеток на поле.

Пример 10. Определение растворимости соединений по изобретению в водной среде.

На диаграммах фиг. 2a-2e растворимость выражают как Log S (ммоль/мл; программное обеспечение ACD/Labs Inc.). Растворимость определяют в водном буфере при различных значениях pH и прогнозируют для чистой воды при 25°C. Алгоритм использует набор >6800 соединений в качестве эталона. Диаграммы показывают, что азапаноны по изобретению могут обладать существенно повышенной растворимостью, например в 2 раза или более, в водной среде при физиологических pH, таких как pH от 6 до 8, в частности от 7,0 до 7,5, по сравнению с соответствующими замещенными пиперидин-4-онами.

Пример 11. Азапаны/азапаноны по изобретению демонстрируют более высокую цитотоксичность, чем структурно соответствующие пиперидины/пиперидин-4-оны.

На фиг. 3b, 3d, 3f представлены диаграммы, иллюстрирующие цитотоксичность соединений по изобретению № 1546, 1547 и 1570 с 7-членным циклическим фрагментом по сравнению со структурно соответствующими соединениями, не включенными в изобретение, с 6-членным циклическим фрагментом. Их индукцию дозозависимой цитотоксичности определяют после 72 ч непрерывного воздействия соединением на репортерную клеточную линию HCT-116. Обработанные клетки сравнивают с необработанными контролями. Цитотоксичность визуализируют как коэффициент выживания (SI) в диапазоне примерно от 90% SI до примерно 0% SI в зависимости от концентрации соединения. Из фигур ясно, что соединения по изобретению являются более цитотоксичными, чем контрольные соединения, так как они производят такой же уровень цитотоксичности при меньшей концентрации.

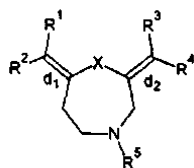
## Ссылки

1. Masdehors, P et al., *Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin*. Br J Haematol 105, 752-757, doi:bjh1388 [pii] (1999).
2. DeMartino, G N et al., *PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide binding protein family*. J Biol Chem 269, 20878-20884, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8063704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063704) (1994) (1994).
3. Rechsteiner, M et al., *The multicatalytic and 26 S proteases*. J Biol Chem 268, 6065-6068, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8454582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8454582) (1993).
4. Adams, J & Kauffman, M, *Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib)*. Cancer Invest 22, 304-311, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15199612](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15199612) (2004).
5. Erdal, H et al., *Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 192-197, doi:0408592102 [pii]10.1073/pnas.0408592102 (2005).
6. Berndtsson, M et al., *Induction of the lysosomal apoptosis pathway by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system*. Int J Cancer 124, 1463-1469, doi:10.1002/ijc.24004 (2009).
7. Lamb, J et al., *The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease*. Science 313, 1929-1935, doi:313/5795/1929 [pii]10.1126/science.1132939 (2006).
8. Adams, J et al., *Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids*. Bioorg Med Chem Lett 8, 333-338 333-338, doi:S0960894X98000298 [pii] (1998).
9. Shibata, T et al., *An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on proteasome*. Biochemistry 42, 13960-13968, doi:10.1021/bi035215a (2003).
10. Yang, H et al., *Celastral, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice*. Cancer Res 66, 4758-4765 4758-4765, doi:66/9/4758 [pii]10.1158/0008-5472.CAN05-4529 (2006).
11. Yang, H et al., *The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry"*. Mol Pharmacol 71, 426-437, doi:mol.106.030015 [pii]10.1124/mol.106.030015 (2007).
12. Menendez-Benito, V et al., *Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system*. Hum Mol Genet 14, 2787-2799, doi:ddi312 [pii]10.1093/hmg/ddi312 (2005).
13. Mullally, J E & Fitzpatrick, F A, *Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death*. Mol Pharmacol 62, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12130688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12130688) (2002).

14. Guterman, A & Glickman, M H, *Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome*. J Biol Chem 279, 17291-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200 [pii] (2004).
15. Hofmann, R M & Pickart, C M et al., *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair*. Cell 96, 645-653, doi:S0092-8674(00)80575-9 [pii] (1999).
16. Vong, Q P et al., *Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of surviving cells*. Science 310, 1499-1504, doi:10.1126/science.1120160 [pii]10.1126/science.1120160 (2005).
17. Borodovsky, A et al., *A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14*. EMBO J 20, 5187-5196, doi:10.1093/emboj/20.18.5187 (2001).
18. Lam, Y A et al., *Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes*. J Biol Chem 272, 28438-28446, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9353303](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353303) (1997).
19. Verma, R et al., *Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome*. Science 298, 611-615, doi:10.1126/science.1075898 [pii]1075898 (2002).
20. Yao, T & Cohen, R E, *A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome*. Nature 419, 403-407, doi:10.1038/nature01071 [pii]1071 (2002).
21. Kramer, G et al., *Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18*. Cancer Res 64, 1751-1756 (2004) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14996736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14996736) (2004).
22. Olofsson, M H et al., *Specific demonstration of drug-induced tumour cell apoptosis in human xenograft models using a plasma biomarker*. Cancer Biomarkers 5, 117-125, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407366> (2009).
23. Reyes-Turcu, F E et al., *Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes*. Annu Rev Biochem 78, 363-397, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19489724](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19489724) (2009).
24. Koulich, E et al., *Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome*. Mol Biol Cell 19, 1072-1082, doi:E07-10-1040 [pii]10.1091/mbc.E07-10-1040 (2008).
25. Bunz, F. et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science 282, 1497-1501 (1998).
26. Pietersen, J A et al., *Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2*. Cancer Res 54, 3714-3717 (1994).
27. Bodnar, A G et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science 279, 349-352 (1998).
28. Lamb, J et al., *The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease*. Science 313, 1929-1935, doi:10.1126/science.1132939 [pii]10.1126/science.1132939 (2006).
29. Elsasser, S et al., *Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis*. Methods Enzymol 398, 353-363, doi:S0076-6879(05)98029-4 [pii]10.1016/S0076-6879(05)98029-4 (2005).
30. Guterman, A & Glickman, M H, *Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome*. J Biol Chem 279, 1729-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200 [pii]10.1074/jbc.M307050200 (2004).
31. Hagg, M et al., *A novel high-throughput assay for screening of pro-apoptotic drugs*. Invest New Drugs 20, 253-259 (2002).
32. Lindhagen, E et al., *The fluorometric microculture cytotoxicity assay*. Nat Protoc 3, 1364-1369, doi:nprot.2008.114 [pii]10.1038/nprot.2008.114 (2008).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение общей структуры S-1, способное аннулировать деубиквитинирующую (DUB) активность 19S RP DUB:



S-1

где  $R^1$ ,  $R^2$  при двойной связи d1 и  $R^3$ ,  $R^4$  при двойной связи d2 могут независимо друг от друга иметь конфигурацию, противоположную конфигурации формулы S1;

X обозначает CO, CS или NH;

$R^1$  и  $R^3$  независимо друг от друга обозначают H или  $C_{1-6}$ алкил;

$R^2$  и  $R^4$  независимо друг от друга обозначают H;  $C_{1-6}$ алкил;  $C_{1-5}$ алкил-CO; фенил или 6-членный гетероарил, необязательно замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих:  $C_{1-6}$ алкил,  $C_{1-6}$ алкокси, CN, -COO- $C_{1-6}$ алкил, COOH, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH- $C_{1-6}$ алкил, N( $C_{1-6}$ алкил)<sub>2</sub>, CONR<sup>7</sup>R<sup>8</sup> при условии, что один или более из H в алкиле и алкокси могут быть замещены атомом фтора;

$R^5$  обозначает любую группу из следующих: H,  $C_{1-6}$ алкил,  $C_{2-6}$ алкенил,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{2-6}$ алкил-,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{2-6}$ алкенил-, арил- $C_{0-6}$ алкил-, гетероарил- $C_{0-6}$ алкил-, циклоалкил- $C_{0-6}$ алкил-, - $C_{1-6}$ алкил-COO- $C_{1-6}$ алкил, - $C_{2-6}$ алкиларилокси, COR<sup>6</sup>;

$R^6$  обозначает любую группу из следующих:  $C_{1-6}$ алкил,  $C_{2-6}$ алкенил,  $C_{1-6}$ алкокси,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{1-6}$ алкил-,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{1-6}$ алкенил-, арил- $C_{0-6}$ алкил-, гетероарил- $C_{0-6}$ алкил-, пирролидинил- $C_{0-6}$ алкил-, циклоалкил- $C_{0-6}$ алкил-, - $C_{1-6}$ алкил-COO- $C_{1-6}$ алкил; NH<sub>2</sub>; -NH- $C_{1-6}$ алкил, -N( $C_{1-6}$ алкил)<sub>2</sub>, - $C_{0-6}$ алкиларилокси;

$R^7$ ,  $R^8$  независимо друг от друга обозначают H или  $C_{1-3}$ алкил,

где гетероарил представляет собой моноциклическую кольцевую систему, имеющую 5 или 6 кольцевых атомов, среди которых один или более независимо выбраны из атома кислорода, азота, серы;

арил представляет собой моноциклический или бициклический углеводород, имеющий от 6 до 10 атомов углерода и содержащий по меньшей мере один ароматический цикл;

циклоалкил представляет собой насыщенный моноциклический углеводород, имеющий от 3 до 7 атомов углерода.

2. Соединение по п.1, где X=CO.

3. Соединение по п.1 или 2, где  $R^1$  и  $R^3$ , оба, обозначают H.

4. Соединение по пп.1-3, где имеет место замещение фенила по одному или нескольким положениям из 3, 4, 5.

5. Соединение по п.1, где X=CO,  $R^1$  и  $R^3$ , оба, обозначают H;  $R^2$  и  $R^4$ , оба, означают 4-фтор-3-нитрофенил;  $R^5$  обозначает COR<sup>6</sup> и  $R^6$  означает винил.

6. Соединение по п.1, где X=CO;  $R^1$  и  $R^3$ , оба, обозначают H;  $R^2$  и  $R^4$ , оба, означают 4-фтор-3-нитрофенил;  $R^5$  обозначает COR<sup>6</sup> и  $R^6$  означает метил.

7. Соединение по п.1, где

$R^1$ ,  $R^2$  при двойной связи d1 и  $R^3$ ,  $R^4$  при двойной связи d2 имеют конфигурацию формулы S-1;

X обозначает CO, CS или NH;

$R^1$  и  $R^3$  независимо друг от друга обозначают H или  $C_{1-6}$ алкил;

$R^2$  и  $R^4$  независимо друг от друга обозначают H,  $C_{1-6}$ алкил,  $C_{1-5}$ алкил-CO, фенил или 6-членный гетероарил, замещенный 1-3 заместителями, выбранными из следующих: CN, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, NH- $C_{1-6}$ алкил, N( $C_{1-6}$ алкил)<sub>2</sub>, CO- $C_{1-6}$ алкил;

$R^5$  обозначает H,  $C_{1-6}$ алкил,  $C_{2-6}$ алкенил,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{1-6}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси- $C_{1-6}$ алкенил, арил, гетероарил,  $C_{1-6}$ алкилгетероарил,  $C_{1-6}$ алкилциклоалкил,  $C_{1-6}$ алкиларил, CO- $C_{1-6}$ алкил, CO-винил, CO-аллил, CO-арил, CO-циклоалкил,

где гетероарил представляет собой моноциклическую кольцевую систему, имеющую 5 или 6 кольцевых атомов, среди которых один или более независимо выбраны из атома кислорода, азота, серы;

арил представляет собой моноциклический или бициклический углеводород, имеющий от 6 до 10 атомов углерода и содержащий по меньшей мере один ароматический цикл;

циклоалкил представляет собой насыщенный моноциклический углеводород, имеющий от 3 до 7 атомов углерода.

8. Соединение по п.7, где X обозначает CO.

9. Соединение по п.7 или 8, где  $R^2$  и  $R^4$  обозначают замещенный фенил.

10. Соединение по любому из пп.7-9, где  $R^5$  выбран из следующих: CO- $C_{1-6}$ алкил, CO-циклоалкил, CO-винил, CO-аллил.

11. Способ лечения раковой опухоли человека, включающий введение фармакологически эффек-

тивной дозы соединения по любому из пп.1-10 в фармацевтически приемлемом носителе.

12. Способ лечения раковой опухоли человека, не восприимчивой к лечению бортезомибом или агентом, вовлеченным в активность бортезомиба по генерированию апоптоза, включающий введение фармакологически эффективной дозы соединения по любому из пп.1-10 в фармацевтически приемлемом носителе.

13. Способ по п.11 или 12, где отсутствует влияние на деубиквитинирующую (DUB) активность не-протеасомных DUB.

14. Способ по любому из пп.11-13, где соединение растворяют или суспендируют в жидком носителе.

15. Способ по пп.11-14, где введение осуществляют посредством внутривенной, внутримышечной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции или инфузии.

16. Способ по п.11 или 12, где введение является пероральным.

17. Способ по п.11 или 12, где носитель представляет собой таблетку или капсулу.

18. Способ по любому из пп.11-17, где фармакологически эффективная доза составляет от 0,0001 до 0,1 г/кг массы тела, в частности от 0,001 до 0,01 г/кг массы тела, при этом даны рекомендации, как вводится агент, системно или локально.

19. Способ по любому из пп.11-18, где рак выбран из множественной миеломы, рака молочной железы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки, рака простаты, рака поджелудочной железы.

20. Фармацевтическая композиция для лечения у человека рака, не восприимчивого к химиотерапии, содержащая соединение по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

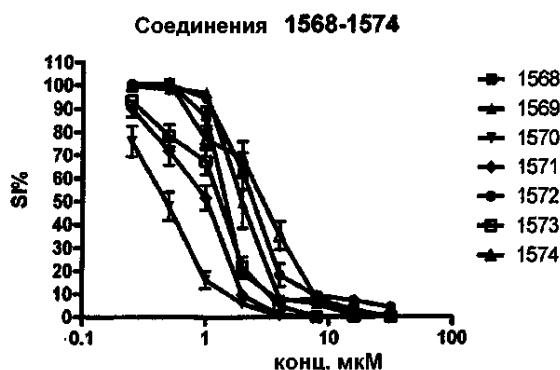
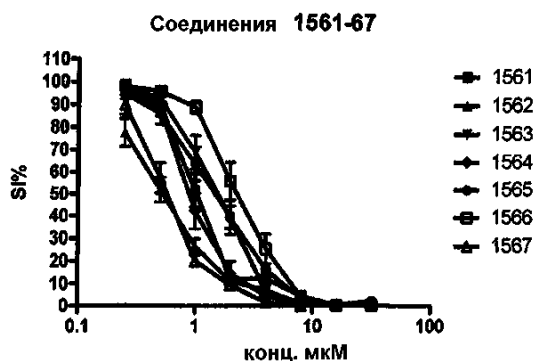
21. Композиция по п.20 в виде таблетки, или капсулы, или другого препарата с разовой дозой для перорального приема.

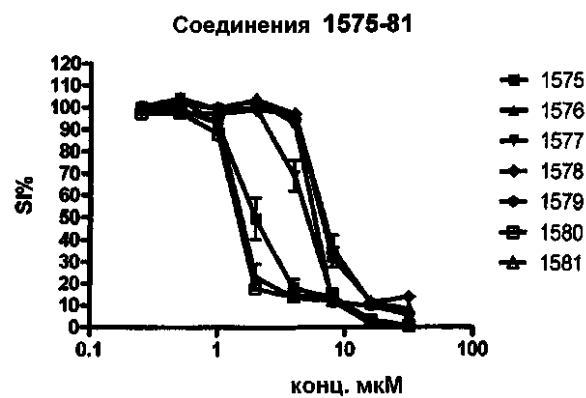
22. Композиция по п.20 в виде раствора или суспензии в фармацевтически приемлемом жидком носителе для инъекции или инфузии.

23. Композиция по п.20 для внутривенной, внутримышечной, внутрибрюшинной или подкожной инфузии или инъекции.

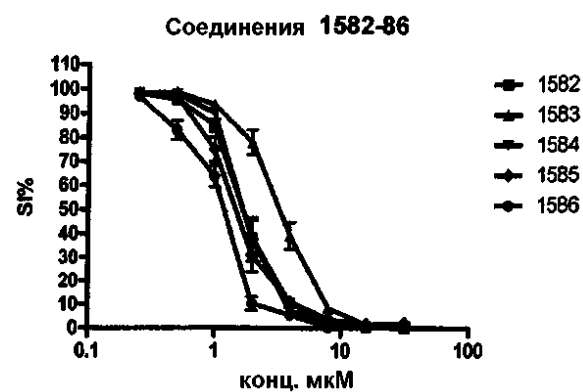
24. Применение соединения по любому из пп.1-10 для лечения у пациента рака, не восприимчивого к химиотерапии.

25. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.20-23 для лечения у пациента рака, не восприимчивого к химиотерапии.

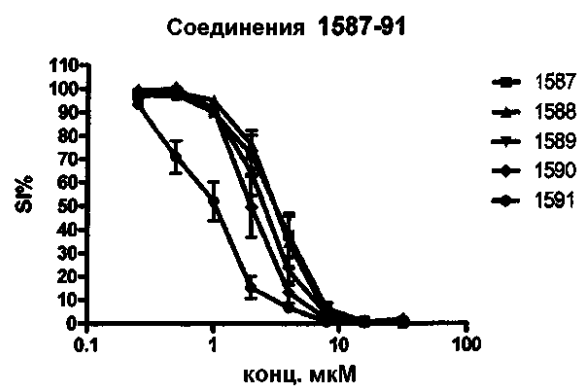




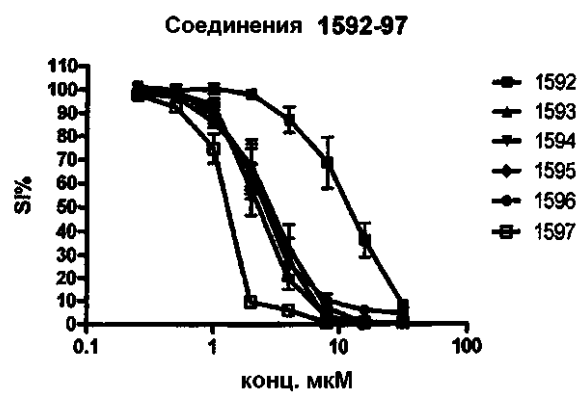
Фиг. 1с



Фиг. 1d

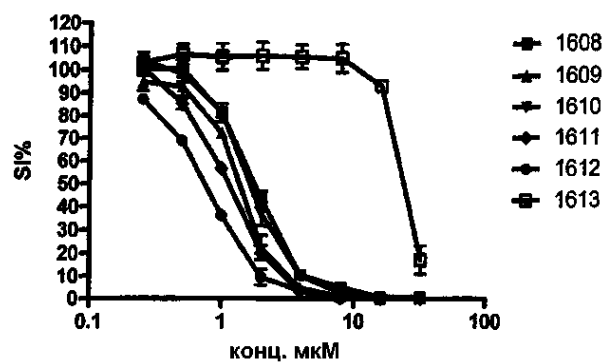


Фиг. 1e



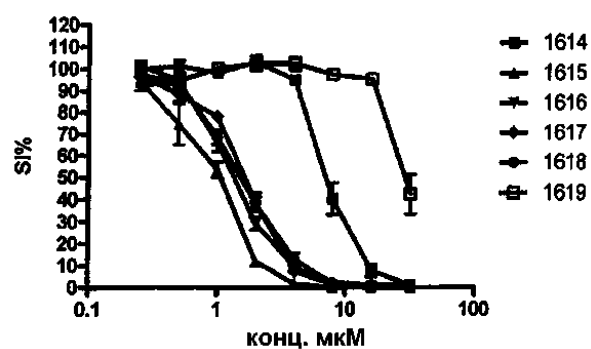
Фиг. 1f

## Соединения 1608-1613



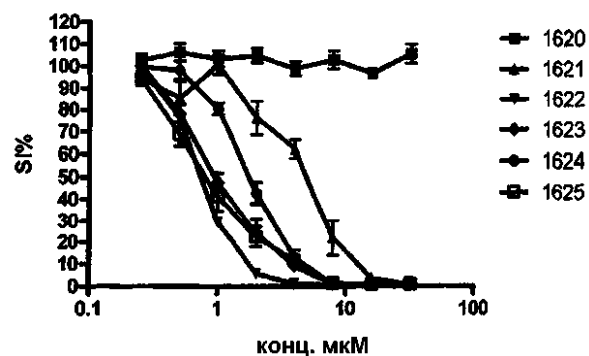
Фиг. 1g

## Соединения 1614-1619



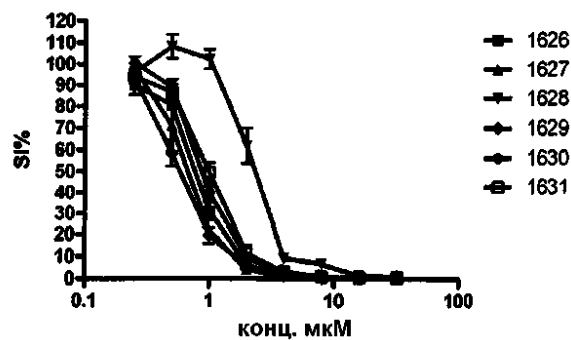
Фиг. 1h

## Соединения 1620-1625



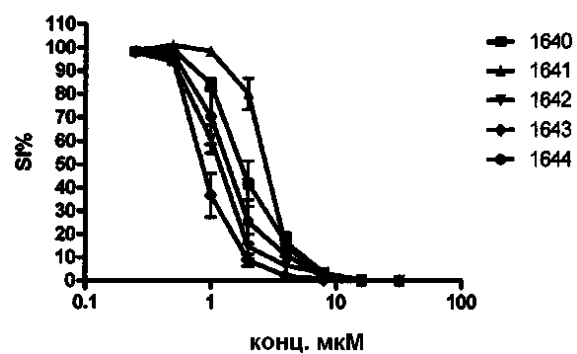
Фиг. 1i

## Соединения 1626-1631



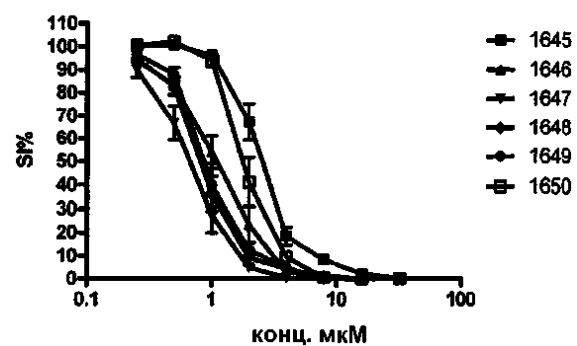
Фиг. 1j

## Соединения 1640-1644



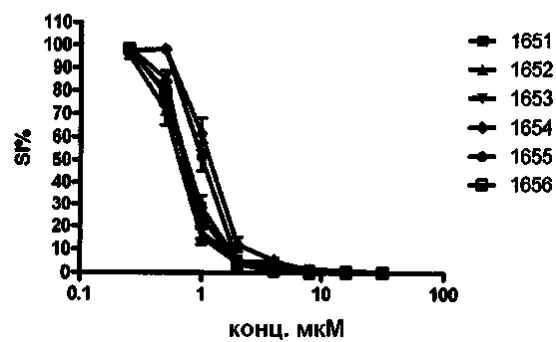
Фиг. 1k

## Соединения 1645-1650



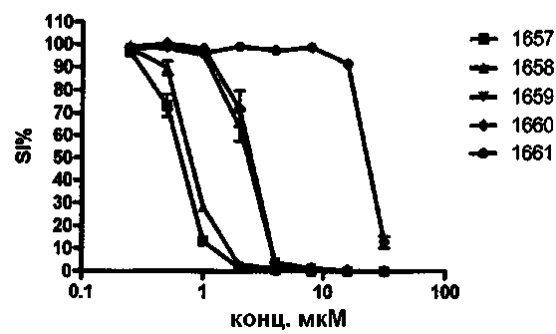
Фиг. 1l

## Соединения 1651-1656

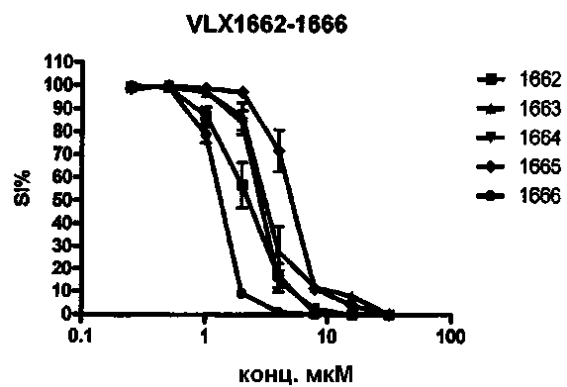


Фиг. 1m

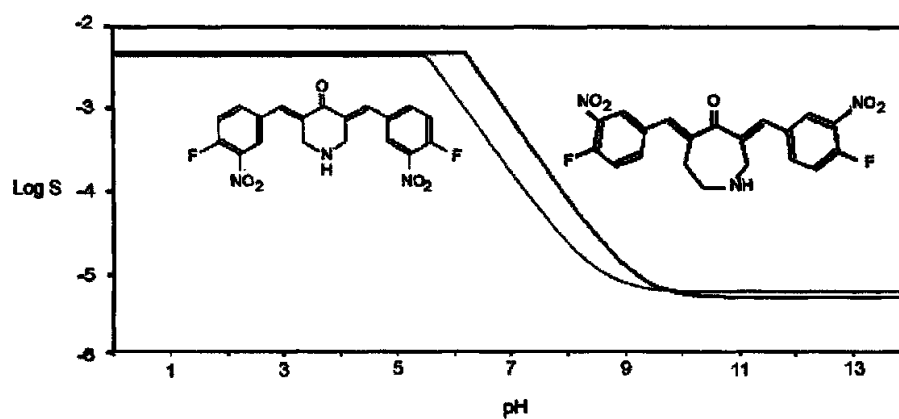
## Соединения 1657-1661



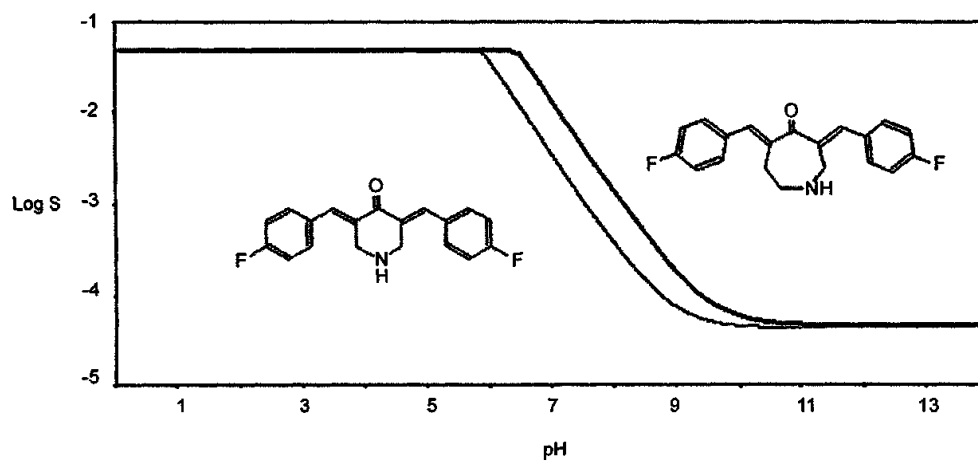
Фиг. 1n



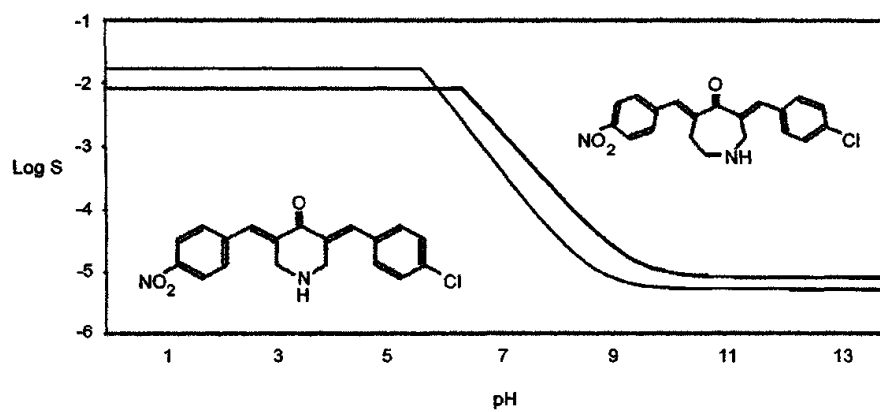
Фиг. 1о



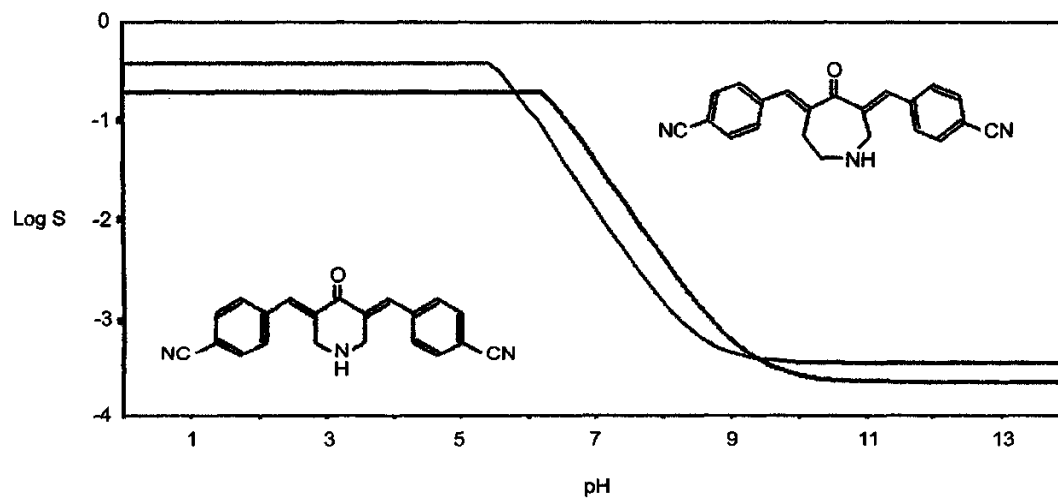
Фиг. 2а



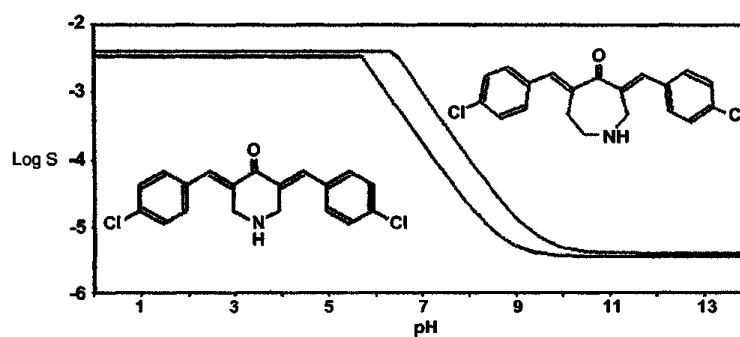
Фиг. 2b



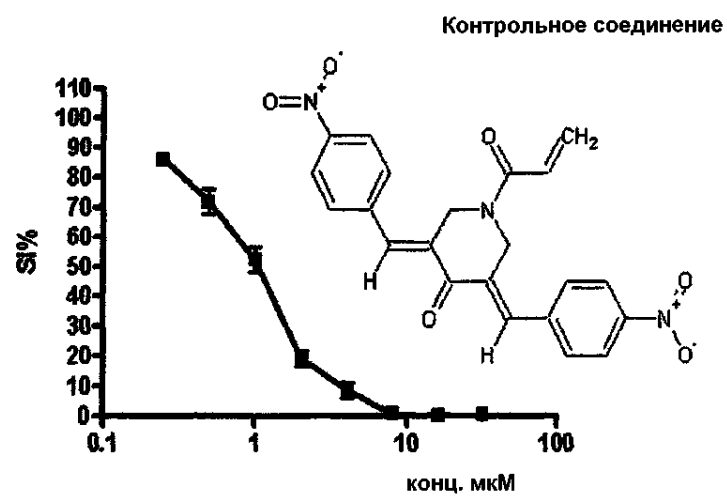
Фиг. 2с



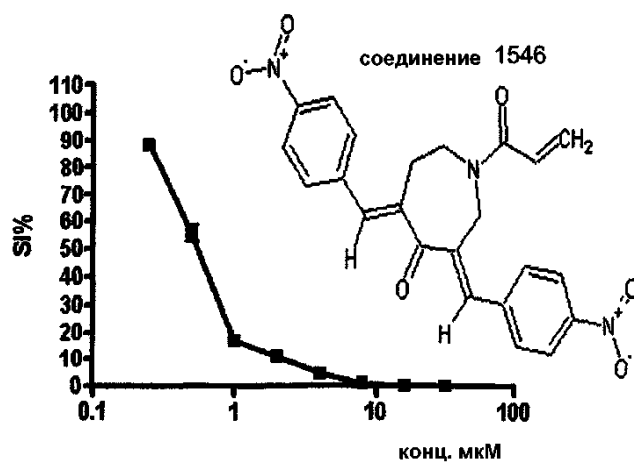
Фиг. 2d



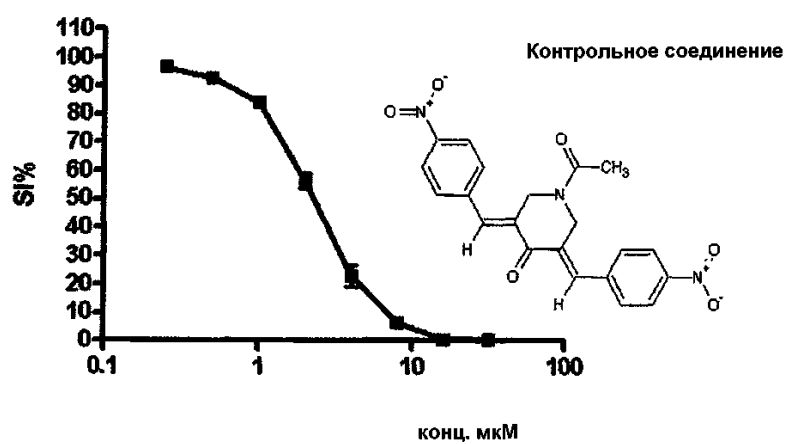
Фиг. 2e



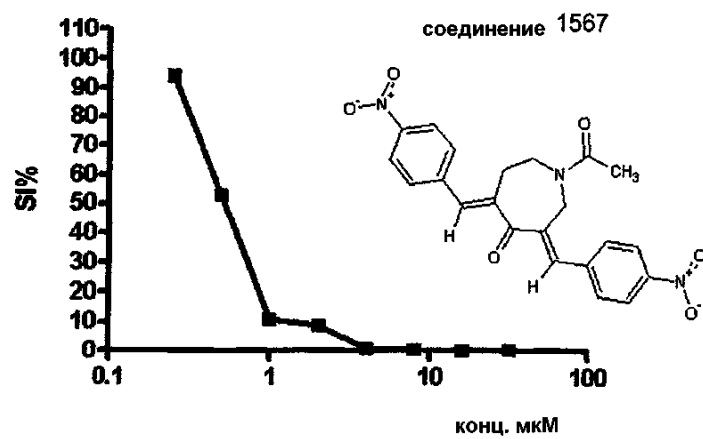
Фиг. 3a



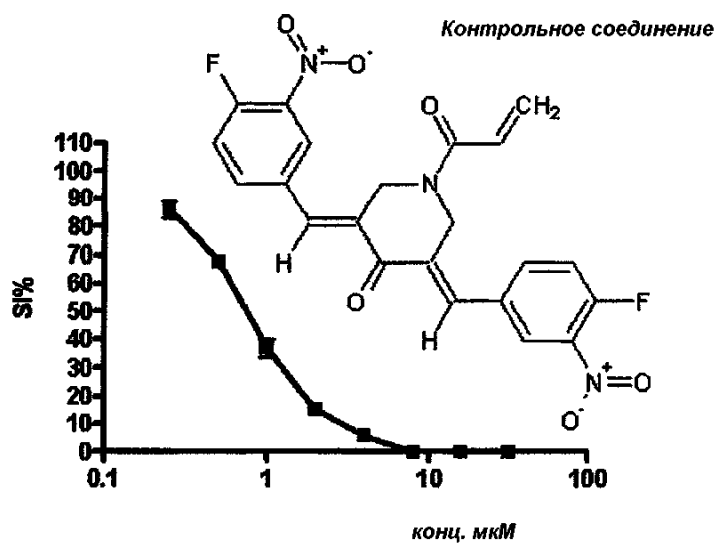
Фиг. 3b



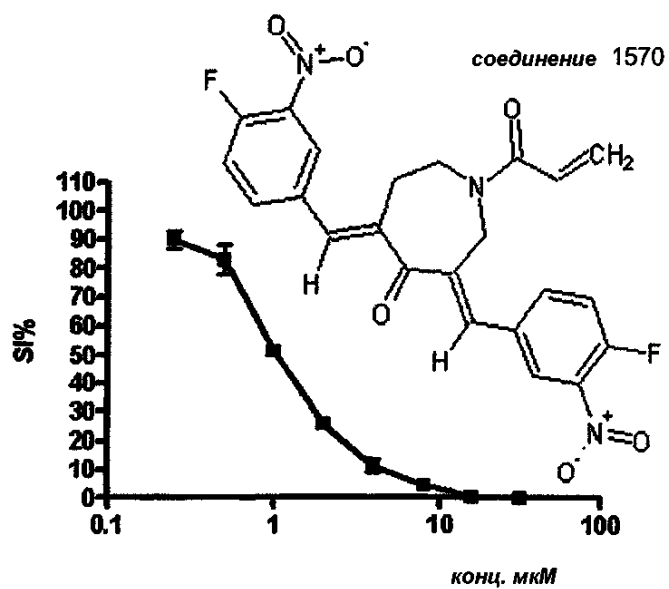
Фиг. 3c



Фиг. 3d



Фиг. 3e



Фиг. 3f

