

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044668**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2023.09.21</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>202192513</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2020.03.13</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <b>C07D 239/94</b> (2006.01)<br/><b>C07D 405/04</b> (2006.01)<br/><b>C07D 405/10</b> (2006.01)<br/><b>C07D 491/056</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/4025</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/496</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/517</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/519</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/5377</b> (2006.01)<br/><b>A61K 35/00</b> (2006.01)</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(31) <b>62/819,322; 62/904,241</b></p> <p>(32) <b>2019.03.15; 2019.09.23</b></p> <p>(33) <b>US</b></p> <p>(43) <b>2022.02.14</b></p> <p>(86) <b>PCT/US2020/022743</b></p> <p>(87) <b>WO 2020/190765 2020.09.24</b></p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ<br/>ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ<br/>(US)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Натансон Дэвид А., Джунг Майкл Е.,<br/>Тсанг Джонатан, Урнер Лоренц,<br/>Кларк Питер М., Клогези Тимоти Ф.,<br/>Ким Гиудонг (US)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Медведев В.Н. (RU)</b></p> | <p>(56) <b>GB-A-2033894<br/>WO-A2-2016100347<br/>CHILIN Andriana et al.: "Exploring Epidermal<br/>Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Features:<br/>The Role of Fused Dioxxygenated Rings on<br/>the Quinazoline Scaffold", Journal of Medicinal<br/>Chemistry, 2010, 53(4), p. 1862-1866, DOI:<br/>10.1021/jm901338g, abstract, compounds 6-10a-c,<br/>table 1, fig. 1, 2<br/>NARLA Rama Krishna et al.: "4-(3'-<br/>Bromo-4'hydroxylphenyl)-amino-6,7-<br/>dimethoxyquinazoline: A Novel Quinazoline<br/>Derivative with Potent Cytotoxic Activity against<br/>Human Glioblastoma Cells", Clinical cancer research,<br/>1998, 4(6), p. 1405-1414, PMID: 9626456, abstract,<br/>table 1<br/>NARLA Rama Krishna et al.: "Inhibition<br/>of human glioblastoma cell adhesion and<br/>invasion by 4-(4'-hydroxylphenyl)-amino-6,7-<br/>dimethoxyquinazoline (WHI-P131) and 4-(3'-<br/>bromo-4'-hydroxylphenyl)-amino-6,7-<br/>dimethoxyquinazoline (WHI-P154)", Clinical cancer<br/>research, 1998, 4(10), p. 2463-2471, PMID: 9796979,<br/>abstract<br/>WO-A1-2019067543</b></p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- (57) Изобретение относится к соединениям, которые способны проникать через гематоэнцефалический барьер, чтобы модулировать активность тирозинкиназы EGFR. Изобретение также относится к способам лечения глиобластомы и других видов рака, опосредованных EGFR. Изобретение также относится к способам лечения глиобластомы и других видов рака, опосредованных EGFR, которые, как было установлено, изменяют метаболизм глюкозы в присутствии ингибиторов. В изобретении также представлены способы введения субъекту ингибитора метаболизма глюкозы и цитоплазматического стабилизатора p53.

**B1****044668****044668****B1**

### Родственные заявки

В настоящей заявке испрашиваются преимущества предварительных заявок США № 62/819332, поданной 15 марта 2019 г., и 62/904241, поданной 23 сентября 2019 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Глиобластома (мультиформная глиобластома; GBM) составляет большинство первичных злокачественных опухолей головного мозга у взрослых. Амплификация и мутация гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является характерной генетической аномалией, встречающейся при GBM (Sugawa et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci., 87:8602-8606; Ekstrand et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci., 89:4309-4313). В настоящее время разрабатываются или проходят клинические испытания для лечения GBM ряд потенциальных терапевтических средств, нацеленных на EGFR или его мутантную конститутивно активную форму, AEGFR, включая ингибиторы тирозинкиназы (TKI), моноклональные антитела, вакцины и средства на основе РНК. Однако на сегодняшний день их эффективность в лечебном учреждении ограничена как первичной, так и приобретенной лекарственной устойчивостью (Taylor et al. (2012), Curr. Cancer Drug Targets., 12:197-209). Основным ограничением является то, что современные методы лечения, такие как эрлотиниб, лапатиниб, gefитиниб и афатиниб, плохо проникают в мозг (Razier et al. (2010), Neuro-Oncology, 12:95-103; Reardon et al. (2015), Neuro-Oncology, 17:430-439; Thiessen et al. (2010), Cancer Chemother. Pharmacol., 65:353-361).

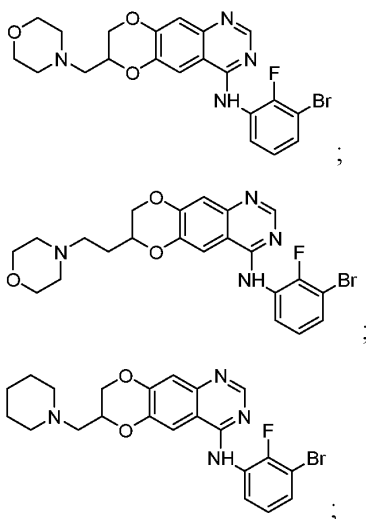
Молекулярная целевая терапия произвела революцию в лечении рака и проложила путь современной точной медицине. Однако несмотря на четко определенные действенные генетические изменения целевые препараты не помогли пациентам с глиобластомой (GBM). Это в значительной степени связано с недостаточным проникновением в ЦНС большинства целевых агентов до уровней, необходимых для уничтожения опухоли; потенциально вызывая надежные адаптивные механизмы для управления терапевтической резистентностью. В то время как комбинации лекарственных средств, которые ингибируют как первичное поражение, так и компенсаторные сигнальные пути, вызывают интерес, этим стратегиям комбинированной терапии препятствует повышенная токсичность, приводящая к подпороговому дозированию каждого лекарственного средства.

Альтернативный терапевтический подход нацелен на онкогенный фактор, чтобы изменить важное функциональное свойство для выживания опухоли, делая клетки уязвимыми для ортогонального второго удара<sup>6</sup>. Эта "синтетическая летальная" стратегия может быть особенно привлекательной, когда функциональная сеть(и), регулируемая онкогеном, пересекается с путями гибели опухолевых клеток. В определенном примере онкогенная передача сигналов стимулирует метаболизм глюкозы, подавляя внутренний апоптоз и способствуя выживанию. Подавление онкогенных факторов с помощью целевой терапии может запускать внутренний механизм апоптоза как прямое следствие пониженного потребления глюкозы. Взаимосвязанная природа этих онкогенных путей может предоставить терапевтические возможности для рационального комбинированного лечения, однако это еще предстоит исследовать.

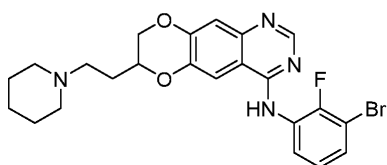
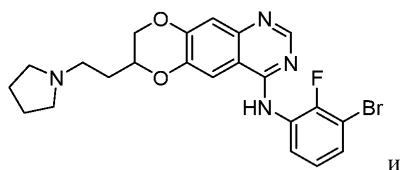
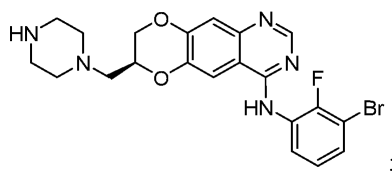
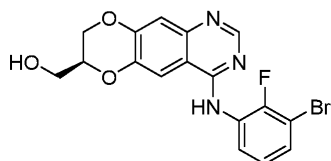
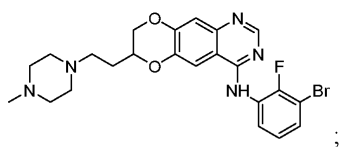
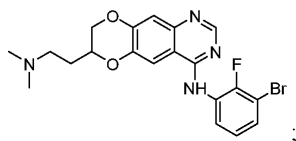
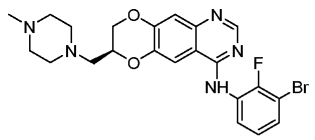
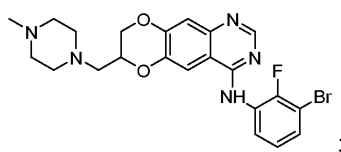
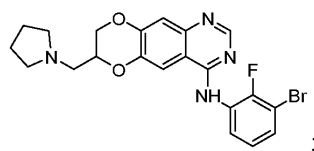
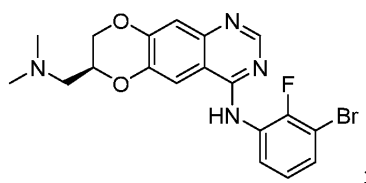
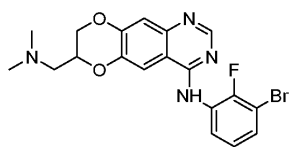
Ввиду вышеизложенного остается клиническая необходимость в химиотерапевтических средствах, проникающих в мозг, для лечения глиобластомы и других видов рака.

### Сущность изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены соединения, выбранные из группы, состоящей из



044668



или их фармацевтически приемлемая соль.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака, который можно лечить ингибированием EGFR, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении рака, количества соединения по изобретению. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показана фармакокинетика при пероральном введении JGK005 при 10 мг/кг и фармакокинетика при пероральном введении эрлотиниба при 25 мг/кг. JGK005 характеризуется хорошим проникновением в ЦНС по сравнению с эрлотинибом.

На фиг. 2 показана активность эрлотиниба (левые столбцы) и JGK005 (правые столбцы) против мутантных по EGFR глиобластом НК301 и GBM39 соответственно. JGK005 имеет более низкую активность, чем эрлотиниб в обоих случаях.

На фиг. 3 показаны активности внеклеточной киназы EGFR эрлотиниба и JGK010. Оба соединения имеют значение IC<sub>50</sub> приблизительно 8 нМ.

На фиг. 4 показана эффективность эрлотиниба (левые столбцы), JGK005 (центральные столбцы) и JGK010 (правые столбцы) против клеток НК301 и GBM39.

На фиг. 5 показана фармакокинетика при пероральном введении JGK005 при 10 мг/кг и JGK010 при 10 мг/кг.

На фиг. 6 показаны сравнения ингибиторов EGFR в нескольких клеточных линиях первичной глиобластомы. Столбцы 1-4: GBM39 (EGFRvIII), 5-8: GS100 (EGFRwt/EGFRvIII), 9-12: GS017 (A289T), 13-16: GS024 (полисомия EGFR).

На фиг. 7A показана активность JGK010 в измененном по EGFR раке легкого. На фиг. 7B показана активность JGK010 в эпидермоидной карциноме EGFR Amp.

На фиг. 8A показана фармакокинетика JGK010 при пероральном введении при 6 мг/кг. На фиг. 8B показана фармакокинетика JGK010 при пероральном введении при 10 мг/кг. На фиг. 8C показана фармакокинетика JGK010 при внутривенном введении при 6 мг/кг. На фиг. 8D показана фармакокинетика JGK010 при внутрибрюшинном введении при 6 мг/кг.

На фиг. 9 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против EGFR Amp WT+vIII НК301.

На фиг. 10 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против EGFR vIII Amp GBM 39.

На фиг. 11 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против клеток НК301.

На фиг. 12 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению против клеток GBM39.

На фиг. 13A показано ингибирование с помощью фосфор-EGFR vIII эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению. На фиг. 13B показано ингибирование с помощью фосфор-EGFR vIII эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 14A показана фармакокинетика JGK005. На фиг. 14B показана фармакокинетика JGK005.

На фиг. 15A показана фармакокинетика JGK038. На фиг. 15B показана фармакокинетика JGK038.

На фиг. 16A показана фармакокинетика JGK010. На фиг. 16B показана фармакокинетика JGK010.

На фиг. 17A показана фармакокинетика JGK037. На фиг. 17B показана фармакокинетика JGK037.

На фиг. 18A показано сравнение фармакокинетики эрлотиниба и JGK037 в головном мозге/крови мышцы. На фиг. 18B показано сравнение фармакокинетики эрлотиниба и JGK037 в головном мозге/крови мышцы.

На фиг. 19 показано проникновение в мозг эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 20 показан эффект лечения либо носителем, либо JGK037 на изменение RLU.

На фиг. 21A-21F показано ингибирование EGFR-вызванного метаболизма глюкозы, которое вызывает минимальную гибель клеток животных, но вызывает у клеток GBM апоптоз. На фиг. 21A показано процентное изменение поглощения <sup>18</sup>F-FDG через 4 ч после обработки эрлотинибом относительно носителя в 19 глиомасферах GBM, полученных от пациентов. "Клетки с метаболической реакцией" - это образцы, которые показывают значительное снижение поглощения <sup>18</sup>F-FDG по сравнению с носителем, тогда как "клетки без метаболической реакции" не показывают значительного снижения. На фиг. 21B показано процентное изменение потребления глюкозы и выработки лактата за 12 ч обработки эрлотинибом относительно носителя. Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. На фиг. 21C показано окрашивание аннексином V клеток с метаболической реакцией (синие, n=10) или клеток без метаболической реакции (красные, n=9) после обработки эрлотинибом в течение 72 ч. На фиг. 21D показано процентное изменение в праймировании относительно контрольного носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома c, с последующим воздействием каждого пептида BH3 (BIM, BID или PUMA) у пациентов с метаболической реакцией или без метаболической реакции, получавших эрлотиниб в течение 24 ч. На фиг. 21E слева показан иммуноблот лизата цельных клеток НК301,

сверхэкспрессирующих контроль GFP или GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3). Справа: изменения в потреблении глюкозы или выработке лактата НК301-GFP или НК301-GLUT1/3 через 12 ч после обработки эрлотинибом. Значения относятся к контролю-носителю. На фиг. 21F показано использование клеток НК301-GFP или НК301-GLUT1/3. Концентрация эрлотиниба для всех экспериментов составляла 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

На фиг. 22A-22H показано связывание цитоплазматического p53 с EGFR для внутреннего апоптоза. На фиг. 22A показан иммуноблот указанных белков у двух клеток с метаболической реакцией (НК301 и НК336), экспрессирующих белок CRISPR/CAS9 с контрольной направляющей РНК (sgCtrl) или направляющей РНК p53 (P53KO). На фиг. 22B показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома c, с последующим воздействием пептида BIM в клетках sgCtrl и P53KO, обработанных эрлотинибом в течение 24 ч. На фиг. 22C показан иммуноблот указанных белков в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и P53KO+p53<sup>wt</sup>. На фиг. 22D показана иммунофлуоресценция белка p53 в комбинации с окрашиванием DAPI для выявления локализации белка в НК301 sgCtrl, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и P53KO+p53<sup>wt</sup> (масштабные метки=20 мкм). Сначала глиомасферы были отделены от отдельных клеток и прикреплены к 96-луночным планшетам с использованием Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Затем прикрепленные клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 10 мин, затем трижды промывали PBS. Затем клетки инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 10% FBS и 3% BSA в PBS, в течение 1 ч, а затем инкубировали с антителом p53 (Santa Cruz, SC-126, разведение 1:50) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки инкубировали со вторичным антителом (Alexa Fluor 647, разведение 1:2000) в течение 1 ч и окрашиванием DAPI в течение 10 мин, затем визуализировали с помощью микроскопа Nikon TI Eclipse, оснащенного флуоресцентной камерой Cascade II (Roper Scientific). Клетки были визуализированы с излучениями при 461 и 647 нМ, а затем обработаны с использованием программного обеспечения для анализа NIS-Elements AR. На фиг. 22E показаны изменения в указанных уровнях мРНК с последующим обработкой 100 нМ доксорубицина в течение 24 ч в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и P53KO+p53<sup>wt</sup>. Уровни нормализованы относительно клеток, обработанных ДМСО. На фиг. 22F показаны данные, аналогичные 22B, но в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и P53KO+p53<sup>wt</sup>. На фиг. 22G показаны данные, аналогичные 22E, но в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>R175H</sup>, P53KO+p53<sup>R273H</sup> и P53KO+p53<sup>NES</sup>. На фиг. 22H показаны данные, аналогичные 22B и 22F, но в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>R175H</sup>, P53KO+p53<sup>R273H</sup> и P53KO+p53<sup>NES</sup>. Концентрация эрлотиниба для всех экспериментов составляла 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

На фиг. 23A-23F показано, как Bcl-xL предотвращает гибель клеток GBM, связываясь с цитоплазматическим p53 и секвестрируя его у клеток с метаболической реакцией на EGFRi. На фиг. 23A показана иммунопреципитация p53 в двух клетках с метаболической реакцией (НК301 и GBM39) через 24 ч после обработки эрлотинибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). На фиг. 23B показаны данные, аналогичные 23A, но в двух клетках без метаболической реакции (НК393 и НК254). На фиг. 23C показаны данные, аналогичные 23A и 23B, но в НК301-GFP и НК301-GLUT1/3. Справа показаны иммуноблоты для указанных вводов. На фиг. 23D показана обработка НК301 в течение 24 ч эрлотинибом, WENI-539 или обоими, и иммунопреципитацию и иммуноблоттинг выполняли, как описано ранее. На фиг. 23E показано окрашивание аннексином V у двух клеток с метаболической реакцией (GBM39 и НК301) и у клетки без метаболической реакции (НК393) через 72 ч после обработки эрлотинибом, WENI-539 или обоими. На фиг. 23F показано окрашивание аннексином V НК301-GFP и НК301-GLUT1/3 через 72 ч после обработки эрлотинибом, wehi-539 или обоими. Концентрации эрлотиниба и WENI-539 для всех экспериментов составляли 1 и 5 мкМ соответственно. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

На фиг. 24A-24G показана синергическая летальность объединенного нацеливания EGFR и p53. На фиг. 24A показана сводная информация изменений в EGFR и генах, вовлеченных в регуляцию p53 по 273 образцам GBM. Генетические изменения в EGFR (amp/мутация) являются взаимоисключающими по сравнению с изменениями в p53. Как показано, изменения EGFR находятся в левой части таблицы, в то время как большинство изменений в p53 - справа. На фиг. 24B показана таблица, указывающая на значительную связь между изменениями в EGFR и генами, участвующими в пути p53. На фиг. 24C показано окрашивание аннексином V клетки с метаболической реакцией (слева: НК301) и клетки без реакции (справа: GS017), обработанных различными концентрациями эрлотиниба, нутлина и в комбинации, представленные в виде матрицы для титрования дозы. На фиг. 24D показано титрование дозы эрлотиниба и нутлина, как описано в 24C, было проведено для 10 пациентов с метаболической реакцией и 6 паци-

ентов без реакции, и была рассчитана оценка синергизма (см. материалы и методы). На фиг. 24Е показано окрашивание аннексином V НК301-GFP и НК301 GLUT1/3 через 72 ч после обработки эрлотинибом, нутлином или обоими. На фиг. 24F показаны аналогичные данные, как на 24Е, но в НК301-sgCtrl и НК301-P53KO. На фиг. 24G показано НК301, обработанной в течение 24 ч эрлотинибом, нутлином или в комбинации. Иммунопреципитацию проводили контрольным антителом иммуноглобулина G или антителом против p53 и иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). Все данные являются репрезентативными по меньшей мере для  $n=3$  независимых экспериментов, среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Если не указано иное, концентрации эрлотиниба и нутлина для всех экспериментов составляли 1 и 2,5 мкМ соответственно. \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ , \*\*\*\*  $p<0,0001$

На фиг. 25А-25F показана модуляция метаболизма глюкозы, вызывающая p53-опосредованную гибель клеток у пациентов без метаболической реакции на EGFRi. На фиг. 25А показано процентное изменение поглощения  $^{18}\text{F}$ -FDG через 4 ч после обработки эрлотинибом, 2DG или пиктилизибом по сравнению с носителем в НК393 и НК254. На фиг. 25В показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с, с последующим воздействием пептида ВІМ в НК393 и НК254, затем эрлотиниба, 2DG или пиктилизоба в течение 24 ч. На фиг. 25С показаны данные, аналогичные 25В, но в НК393 sgCtrl и P53KO. На фиг. 25D показана иммунопреципитация p53 в НК393 и НК254 через 24 ч после обработки 2DG или пиктилизибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). На фиг. 25Е показан показатель синергизма различных лекарственных средств (эрлотиниб, 2DG и пиктилизиб) в комбинации с нутлином НК393 и НК254. На фиг. 25F показано окрашивание аннексином V НК393 sgCtrl и НК393 P53KO через 72 ч после обработки 2DG, пиктилизибом, 2DG+нутлином или пиктилизибом+нутлином. Если не указано иное, концентрации эрлотиниба, 2DG, пиктилизоба и нутлина для всех экспериментов составляли 1 мкМ, 1 мМ, 1 и 2,5 мкМ соответственно. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения  $\pm$  значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ .

На фиг. 26А-26Н показано комбинированное нацеливание на поглощение глюкозы, вызванное EGFR, и подавление p53 роста опухоли *in vivo*. На фиг. 26А показана ПЭТ-КТ визуализация с помощью  $^{18}\text{F}$ -FDG внутричерепных ксенотрансплантатов GBM39 до и после 15 ч обработки эрлотинибом (75 мг/кг). На фиг. 26В показаны внутричерепные ксенотрансплантаты GBM39, обработанные носителем ( $n=5$ ), 75 мг/кг эрлотиниба ( $n=7$ ), 50 мг/кг идасанутлина ( $n=5$ ) или комбинацией ежедневно ( $n=12$ ), и опухолевую массу оценивали в указанные дни с использованием секретируемой люциферазы *gaussia* (см. материалы и методы). На фиг. 26С показаны данные, аналогичные 26А, но в внутричерепных ксенотрансплантатах НК393. На фиг. 26D показаны данные, аналогичные 26В, но в внутричерепных ксенотрансплантатах НК393 ( $n=7$  для всех групп). На фиг. 26Е показан процент выживаемости для 26В. На фиг. 26F показан процент выживаемости для 26С. На фиг. 26G показан процент выживаемости клеток НК336 с метаболической реакцией с последующими указанными обработками в течение 25 дней и с последующим высвобождением из лекарственного средства ( $n=7$  для всех групп). На фиг. 26Н показан процент выживаемости клеток без метаболической реакции GS025 с последующими указанными обработками в течение 25 дней и с последующим высвобождением из лекарственного средства ( $n=9$  для всех групп). Сравнения для 26В и 26D использовали наборы данных из последних измерений и были сделаны с использованием двустороннего непарного t-критерия. Данные представляют средние значения  $\pm$  значения s.e.m. \*\*  $p<0,01$ .

На фиг. 27А-27G показана характеристика клеточных линий GBM после ингибирования EGFR. На фиг. 27А показано процентное изменение в поглощении  $^{18}\text{F}$ -FDG в указанные моменты времени обработки эрлотиниба относительно носителя в двух клетках с метаболической реакцией (НК301 и GBM39). На фиг. 27В показан иммуноблот указанных белков клетки с метаболической реакцией (НК301) и клетки без метаболической реакции (НК217) после генетического нокдауна EGFR с помощью миРНК. На фиг. 27С показано процентное изменение в поглощении  $^{18}\text{F}$ -FDG в НК301 и НК217 после генетического нокдауна EGFR. На фиг. 27D показано изменение в потреблении глюкозы с помощью 12 ч обработки эрлотинибом в трех клетках с метаболической реакцией (НК301, GBM39, НК390) и трех клетках без метаболической реакции (НК393, НК217, НК254). Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. На фиг. 27Е показано изменение в выработке лактата с помощью 12 ч обработки эрлотинибом в трех клетках с метаболической реакцией (НК301, GBM39, НК390) и трех клетках без метаболической реакции (НК393, НК217, НК254). Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. На фиг. 27F показаны основные измерения ECAR двух клеток с метаболической реакцией (НК301 и GBM39, голубым цветом) и двух клеток без метаболической реакции (НК217 и НК393, красным цветом) через 12 ч после обработки эрлотинибом. На фиг. 27G показано изменение потребления глутамина через 12 ч после обработки эрлотинибом, измеренное с помощью анализатора Nova Biomedical BioProfile. Концентрации эрлотиниба для всех экспериментов составляли 1 мкМ. Сравнения

проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения  $\pm$  значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

На фиг. 28А, 28В показаны изменения нижестоящей передачи сигналов после ингибирования EGFR, коррелирующие с метаболической реакцией. На фиг. 28А показан иммуноблот указанных белков через 4 ч после обработки эрлотинибом в клетках с метаболической реакцией. На фиг. 28В показан иммуноблот указанных белков через 4 ч после обработки эрлотинибом в клетках без метаболической реакции.

На фиг. 29А, 29В показана генетическая характеристика клеточных линий GBM, полученных от пациентов. На фиг. 29А показан генетический фон на панели линий GBM. На фиг. 29В показана флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) НК390, НК336, НК254 и НК393, демонстрирующих полисомию EGFR. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) выполняли с использованием коммерчески доступного флуоресцентно меченного двухцветного зонда EGFR (красный)/CEP 7 (зеленый) (Abbott-Molecular). Гибридизацию и анализ FISH проводили на клеточных линиях в соответствии с протоколами, предложенными производителем. Клетки докрашивали с помощью DAPI, и сигналы флуоресцентного зонда визуализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss (AxioPhot), оборудованным двухцветными и трехцветными фильтрами.

На фиг. 30А, 30В показан сдвиг путем ингибирования EGFR апоптотического баланса в клетках с метаболической реакцией. На фиг. 30А показан иммуноблот указанных белков через 24 ч после обработки эрлотинибом в клетках с метаболической реакцией (GBM39, НК301 и НК336) и клетках без метаболической реакции (НК217, НК393 и НК254). На фиг. 30В показан пример анализа динамического профилирования ВНЗ в клетке с метаболической реакцией (НК301). Слева: процент высвобождения цитохрома с измеряется после воздействия разных пептидов в указанных концентрациях. Справа: разница в высвобождении цитохрома с между клетками, обработанными носителем, и клетками, обработанными эрлотинибом, рассчитана для получения процента праймирования. Концентрации эрлотиниба для всех экспериментов составляли 1 мкМ.

На фиг. 31А-31С показана сверхэкспрессия GLUT1/3, которая восстанавливает ослабленный метаболизм глюкозы, вызванный ингибированием EGFR. На фиг. 31А показано изменение потребления глюкозы и выработки лактата через 12 ч после обработки эрлотинибом в НК301-GFP и НК301 GLUT1/3. Измерения производятся с помощью анализатор Nova Biomedical BioProfile. На фиг. 31В слева показан иммуноблот лизата цельных клеток GBM39, сверхэкспрессирующих GFP-контроль или GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3). Справа: изменения в потреблении глюкозы или выработке лактата GBM39-GFP или GBM39-GLUT1/3 через 12 ч после обработки эрлотинибом. Значения относятся к контролю-носителю. На фиг. 31С показаны данные, аналогичные 35А, но в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3, концентрации эрлотиниба для всех экспериментов составляли 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения  $\pm$  значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

На фиг. 32А-32I показан цитоплазматический p53, необходимый для EGFRi-опосредованного праймирования апоптоза. На фиг. 32А показано процентное изменение в поглощении  $^{18}\text{F}$ -FDG через 4 ч после обработки эрлотинибом в клетках НК301 sgCtrl и p53 KO (среднее  $\pm$  s.d., n=3). На фиг. 32В показаны относительные уровни мРНК p53-регулируемых генов через 24 ч после обработки 1 мкМ эрлотиниба или 100 нМ доксорубина в НК301 (клетка с метаболической реакцией). На фиг. 32С показаны клетки НК301, инфицированные репортерной системой p53-люцифераза, и активность p53 измеряли через 24 ч после обработки 1 мкМ эрлотиниба (среднее  $\pm$  s.d., n=3). Результаты представляют два независимых эксперимента. На фиг. 32D показан иммуноблот указанных белков в НК336 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup>. На фиг. 32Е показана иммунофлуоресценция белка p53 в комбинации с окрашиванием DAPI для выявления локализации белка в НК336 sgCtrl, p53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup> (масштабные метки=20 мкм). Иммунофлуоресценцию проводили, как описано выше. На фиг. 32F показаны изменения в указанных уровнях мРНК с последующим обработкой 100 нМ доксорубина в течение 24 ч в НК336 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup> (среднее значение  $\pm$  s.d., n=3). Уровни нормализованы относительно клеток, обработанных ДМСО. На фиг. 32G показано процентное изменение в праймировании апоптоза относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с последующим воздействием пептида BIM, в клетках НК336 sgCtrl, p53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup>, обработанных эрлотинибом в течение 24 ч (среднее  $\pm$  s.d., n=2). Результаты представляют два независимых эксперимента. На фиг. 32H показан иммуноблот указанных белков в НК301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53<sup>R175H</sup>, p53KO+p53<sup>R273H</sup> и p53KO+p53<sup>NES</sup>. На фиг. 32I показано процентное изменение праймирования в НК301 через 24 ч после обработки эрлотинибом с или без предварительной обработки PFT $\alpha$  (10 мкМ в течение 2 ч) (среднее  $\pm$  s.d., n=2). Результаты представляют два независимых эксперимента.

На фиг. 33А-33D показано ингибирование EGFR-вызванного метаболизма глюкозы, индуцирующего зависимость Vcl-xL через функции цитоплазматического p53. На фиг. 33А показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с с последующим воздействием пептидов BAD и HRK в клетках с метаболической реакци-

ей (НК301 и НК336) или клетке без метаболической реакции (НК229), обработанных эрлотинибом. На фиг. 33В слева показана иммунопреципитация p53 в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3 через 24 ч после обработки эрлотинибом. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Справа приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). На фиг. 33С показано окрашивание аннексином V НК301 (слева) и НК336 (справа) sgCtrl, p53KO, p53 KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup> через 72 ч после обработки эрлотинибом, WENI-539 или комбинацией. На фиг. 33D показаны данные, аналогичные 33С, но в GBM39-GFP и GBM39-GLUT1/3, концентрации эрлотиниба и WENI-539 для всех экспериментов составляли 1 мкМ. Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

На фиг. 34А-34Н показано ингибирование EGFR-регулируемого метаболизма глюкозы, а активация p53 способствует внутреннему апоптозу в GBM. На фиг. 34А показан иммуноблот указанных белков через 24 ч после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией в двух клетках с метаболической реакцией (НК301 и GBM39). На фиг. 34В показано окрашивание аннексином V в НК301 и НК217 после генетического нокадауна EGFR и последующей обработки нутлином в течение 72 ч. На фиг. 34С показано обнаружение олигомеризации VAX в НК301-GFP и НК301-GLUT1/3. Через 24 ч после указанной обработки клетки собирали и инкубировали в 1 мМ ВМН для стимулирования перекрестного связывания белков и проводили иммуноблоттинг с указанными антителами. Ниже VAX представляет собой иммуноблот для цитозольного цитохрома с после клеточного фракционирования. На фиг. 34D сверху показан иммуноблот указанных белков в НК301-GFP и НК301-NA-BclxL. Снизу: окрашивание аннексином V в НК301-GFP и НК301-NA-BclxL через 72 ч после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией. На фиг. 34Е показано окрашивание аннексином V НК301 через 72 ч предварительной обработки +/-PFT $\mu$ , эрлотинибом, нутлином или комбинацией (10 мкМ в течение 2 ч). На фиг. 34F показано окрашивание аннексином V НК301 sgCtrl, p53KO, p53KO+p53<sup>R175H</sup>, p53KO+p53<sup>R273H</sup> и p53KO+p53<sup>NES</sup> через 72 ч после обработки эрлотинибом, нутлином или комбинацией. На фиг. 34G показаны данные, аналогичные 34F, но в НК301 sgCtrl, P53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup>. Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001. На фиг. 34Н показаны данные, аналогичные 34G, но в НК336 sgCtrl, p53KO, P53KO+p53<sup>cyto</sup> и p53KO+p53<sup>wt</sup>. Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001.

На фиг. 35А-35F показано способствование ингибирования метаболизма глюкозы у пациентов с метаболической реакцией и пациентов без метаболической реакции внутреннему апоптозу. На фиг. 35А показано процентное изменение в праймировании относительно контроля-носителя, как определено с помощью высвобождения цитохрома с, с последующим воздействием пептидов ВІМ в клетке с метаболической реакцией НК301 через 24 ч после обработки эрлотинибом или 2DG. На фиг. 35В слева показана: иммунопреципитация p53 в НК301 через 24 ч после обработки с помощью 2DG. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Справа приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). На фиг. 35С показаны измерения OCR и ECAR клеток НК301 после воздействия олигомицина и ротенона. На фиг. 35D показано окрашивание аннексином V в НК301 через 72 ч после обработки нутлином, эрлотинибом, 2DG, олигомицином, ротеноном в качестве отдельных средств или в комбинации с нутлином. На фиг. 35Е показан иммуноблот указанных белков через 4 ч после обработки эрлотинибом или пиктилизибом в двух клетках без метаболической реакции (НК254 и НК393). На фиг. 35F показана иммунопреципитация p53 в НК254 через 24 ч после обработки пиктилизибом или 2DG. Иммунопреципитат зондировали указанными антителами. Ниже приведены соответствующие лизаты до иммунопреципитации (ввод). Концентрации лекарственных средств для всех экспериментов следующие: эрлотиниб (1 мкМ), нутлин (2,5 мкМ), 2DG (3 мМ для НК301 и 1 мМ для НК254), олигомицин (1 мкМ), ротенон (1 мкМ) и пиктилизиб (1 мкМ). Сравнения проводились с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Данные представляют средние значения ± значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*\*\*\* p<0,0001.

На фиг. 36А-36D показана *in vivo* эффективность ингибирования EGFR и активации p53. На фиг. 36А показаны концентрации идасанутлина в головном мозге и плазме в указанные моменты времени (n=2 мыши/момент времени) у мышей, не несущих опухоль. На фиг. 36В показан иммуногистохимический (ИГХ) анализ экспрессии p53 в ксенотрансплантатах, несущих внутрочерепную опухоль, после 36-часовой обработки идасанутлином (50 мг/кг). На фиг. 36С показано процентное изменение поглощения <sup>18</sup>F-FDG через 15 ч после обработки эрлотинибом во внутрочерепных ксенотрансплантатах GBM39 (n=3) и НК393 (n=5). На фиг. 36D показано изменение массы тела мышей после ежедневной обработки эрлотинибом (75 мг/кг) или комбинацией эрлотиниба (75 мг/кг) и идасанутлина (50 мг/кг). Все обработки про-



водили перорально. Данные представляют средние значения  $\pm$  значения s.e.m. трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ .

На фиг. 37А показано, что прямое ингибирование гликолиза с помощью 2DG (ингибитор гексокиназы) или цитохалазина В (ингибитор переносчика глюкозы) неожиданно действует синергически с активацией p53 (с нутлином). На фиг. 37В показано, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергической гибели клеток путем ингибирования BCL-xL навитоклаком (ABT-263). На фиг. 37С показано, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергической гибели клеток путем ингибирования BCL-xL нутлином.

На фиг. 38 показано сравнение между пациентами с метаболической реакцией на ингибитор EGFRi, эрлотиниб, и пациентами без метаболической реакции. Комбинация эрлотиниба и нутлина приводит к неожиданной синергической синтетической летальности у пациентов с метаболической реакцией, но не у пациентов без метаболической реакции.

На фиг. 39А показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения 5, как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). На фиг. 39В показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения (S)-5, как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). На фиг. 39С показана энантиомерная чистота синтетического промежуточного соединения (R)-5, как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH). На фиг. 39D показана энантиомерная чистота производных эфира Мошера 5, как определено с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH).

На фиг. 40 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, gefитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против U87 EGFRwt.

На фиг. 41 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, gefитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против U87 EGFRviii.

На фиг. 42 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, gefитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против НК301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 43 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба, gefитиниба и иллюстративных соединений по изобретению против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 44 показаны активности эрлотиниба, лапатиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFRvIII мышинной модели GBM39.

На фиг. 45А показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR клеточной линии рака легкого HCC827. На фиг. 45В показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR клеточной линии рака легкого PC9. На фиг. 45С показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной клеточной линии рака легкого H838.

На фиг. 46 показаны активности эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению в мутантной по EGFR мышинной модели рака легкого PC9.

На фиг. 47 показаны определенные метаболиты иллюстративных соединений по изобретению.

На фиг. 48А показана активность иллюстративных соединений по изобретению против НК301. На фиг. 48В показана активность иллюстративных соединений по изобретению против GBM39. На фиг. 48С показана активность иллюстративных соединений по изобретению против NHA.

На фиг. 49А показаны характеристики ADME иллюстративного соединения согласно настоящему изобретению на крысах после введения PO. На фиг. 49В показаны характеристики ADME иллюстративного соединения согласно настоящему изобретению на крысах после введения PO.

На фиг. 50А показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т.е. лапатиниб, эрлотиниб, gefитиниб и AZD3759) против НК301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM. На фиг. 50В показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т.е. лапатиниб, эрлотиниб, gefитиниб и AZD3759) против НК301, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 51А показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т.е. лапатиниб, эрлотиниб, gefитиниб и AZD3759) против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM. На фиг. 51В показана активность определенных соединений по изобретению по сравнению с существующим стандартом лечения (т.е. лапатиниб, эрлотиниб, gefитиниб и AZD3759) против GBM39, полученной от пациента мутантной по EGFRvIII глиомасферы GBM.

На фиг. 52А показана активность озимертиниба и JGK068S против pEGFRwt. На фиг. 52В показана активность озимертиниба и JGK068S против pEGFRvIII.

На фиг. 53А показана активность озимертиниба и JGK068S против НК301. На фиг. 53В показана активность озимертиниба и JGK068S против GBM39.

На фиг. 54А показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против определенных мутантов EGFR. На фиг. 54В показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A263P. На фиг. 54С

показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A289V. На фиг. 54D показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR A289D. На фиг. 54E показана активность AZD3759, AZD9291 и JGK068S против pEGFR G598V.

#### Подробное описание изобретения

Глиомы являются наиболее часто встречающейся формой опухоли головного мозга, причем мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее злокачественной формой, вызывая 3-4% всех смертей, связанных с раком (Louis et al. (2007), *Acta. Neuropathol.*, 114:97-109.). Всемирная организация здравоохранения определяет GBM как рак IV степени, характеризуемый как злокачественный, митотически активный и предрасположенный к некрозу. У GBM очень плохой прогноз: 5-летняя выживаемость составляет 4-5%, а средняя выживаемость GBM составляет 12,6 месяцев (McLendon et al. (2003), *Cancer*, 98:1745-1748). Это можно объяснить уникальными ограничениями лечения, такими как высокий средний возраст начала, локализация опухоли и плохое понимание патофизиологии опухоли (Louis et al. (2007), *Acta. Neuropathol.*, 114:97-109). Лечение GBM включает резекцию опухоли с одновременной лучевой терапией и химиотерапией, и в последние годы было несколько заметных улучшений, которые увеличивают выживаемость (Stewart et al. (2002), *Lancet*, 359:1011-1018.).

Стандарт для химиотерапии GBM - это темозоломид (TMZ), который представляет собой проникающий в мозг алкилирующий агент, который метилирует пурины (A или G) в ДНК и вызывает апоптоз (Stupp et al. (2005), *N. Engl. J. Med.*, 352:987-996). Однако использование TMZ имеет недостатки в том, что значительный риск возникает из-за повреждения ДНК в здоровых клетках, и что клетки GBM могут быстро развить устойчивость к лекарственному средству (Carlsson et al. (2014), *EMBO. Mol. Med.*, 6:1359-1370). Поэтому срочно требуются дополнительные варианты химиотерапии.

EGFR представляет собой член суперсемейства HER рецепторных тирозинкиназ вместе с ERBB2, ERBB3 и ERBB4. Распространенным фактором прогрессирования GBM является накопление EGFR, которое обнаруживается почти в 40% всех случаев GBM (Hynes et al. (2005), *Nat. Rev. Cancer.*, 5:341-354; Hatanpa et al. (2010), *Neoplasia*, 12:675-684). Кроме того, накопление EGFR связано с присутствием вариантов белка EGFR: в 68% мутантов EGFR; имеется делеция в N-концевой лиганд-связывающей области между аминокислотами 6 и 273. Эти делеции в лиганд-связывающих доменах EGFR могут приводить к лиганд-независимой активации EGFR (Yamazaki et al. (1990), *Jpn. J. Cancer Res.*, 81:773-779.).

Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (ТКИ) являются наиболее клинически продвинутыми из терапевтических средств, нацеленных на EGFR, и как обратимые, так и необратимые ингибиторы проходят клинические испытания. Примеры обратимых ингибиторов и необратимых ингибиторов включают эрлотиниб, gefитиниб, лапатиниб, РК1166, канертиниб и пелитиниб (Mischel et al. (2003), *Brain Pathol.*, 13:52-61). Машинально эти ТКИ конкурируют с АТФ за связывание с тирозинкиназным доменом EGFR, однако эти EGFR-связанные ингибиторы тирозинкиназы были относительно неэффективны против глиом, при этом частота ответа достигала 25% в случае эрлотиниба (Mischel et al. (2003), *Brain Pathol.*, 13:52-61; Gan et al. (2009), *J. Clin. Neurosci.*, 16:748-54). Хотя ТКИ хорошо переносятся и проявляют некоторую противоопухолевую активность у пациентов с GBM, повторяющаяся проблема устойчивости к ингибированию рецепторов ограничивает их эффективность (Learn et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10:3216-3224; Rich et al. (2004), *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3:430-446). Кроме того, недавние исследования показали, что концентрации gefитиниба и эрлотиниба в плазме крови головного мозга после терапии составляли всего 6-11% от начальной дозы, что позволяет предположить, что эти соединения могут не преодолевать гематоэнцефалический барьер, как показано в табл. 1 (Karpel-Massler et al. (2009), *Mol. Cancer Res.*, 7:1000-1012). Таким образом, недостаточная доставка к мишени может быть еще одной причиной неутешительных клинических результатов.

Таблица 1

Скорость проникновения в мозг медицинских препаратов действующего стандарта

Соединение	Первичное	Дневная доза	Плазма крови (нг/мл)	CSF (нг/мл)	Скорость проникновения в головной мозг (%)
Афатиниб	EGFR-мутант NSCLC	50	66,7	0,46	0,7
Алектиниб	ALK-мутант NSCLC	1200	1,5 (несвязанная конц.)	1,3	86,7

Кризотиниб	ALK-мутант NSCLC	500	237	0,616	0,26
Эрлотиниб	EGFR-мутант NSCLC	150	1140 ± 937	28,7 ± 16,8	2,77 ± 0,45
	EGFR-мутант NSCLC	1500 (еженедельно)	4445,9	51,1	1,2
Гефитиниб	EGFR-мутант NSCLC	250	326 ± 116	3,7 ± 1,9	1,13 ± 0,36
	EGFR-мутант NSCLC	750-1000	1345,9-5094,4	14,7-143,1	1,07-3,58
Лапатиниб	HER2+рак молочной железы	1250	1515, 3472	1,3, 4,5	0,09, 0,13

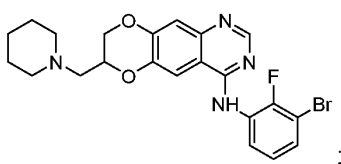
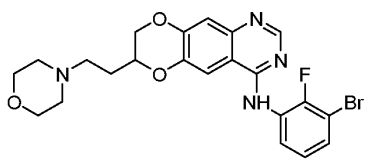
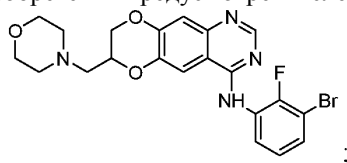
В свете этих данных остается неудовлетворенной клиническая потребность в сильнодействующих ингибиторах тирозинкиназы, которые обладают способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер и лечить, ингибируя EGFR и его изоформы.

Кроме того, авторы изобретения показали, что перекрестная связь между онкогенными сигнальными и метаболическими путями создает возможности для новых комбинированных терапий при GBM. Более конкретно, авторы изобретения обнаружили, что острое ингибирование поглощения глюкозы, вызванного EGFR, вызывает минимальную гибель клеток, но снижает порог апоптоза в клетках GBM, полученных от пациента, и "примирует" клетки для апоптоза. Неожиданно исследования механизма действия авторов изобретения показали, что Bcl-xL блокирует цитоплазматический p53 от запуска внутреннего апоптоза, что приводит к выживанию опухоли. Фармакологическая стабилизация p53 (например, с помощью проникающей в мозг небольшой молекулы идасанутлина) позволяет p53 задействовать внутренний механизм апоптоза, способствуя взаимоусиливающей летальности с нацеленным EGFR-вызванным поглощением глюкозы в ксенотрансплантатах GBM. Примечательно, что авторы изобретения также обнаружили, что быстрые изменения в поглощении <sup>18</sup>F-фтордезоксиглюкозы (<sup>18</sup>F-FDG), используя, например, неинвазивную позитронно-эмиссионную томографию, можно предсказать чувствительность к комбинации *in vivo*.

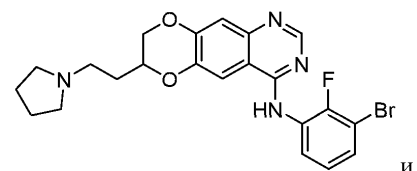
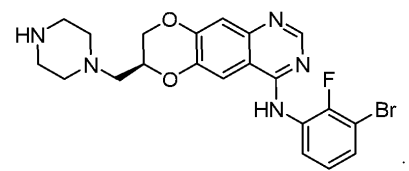
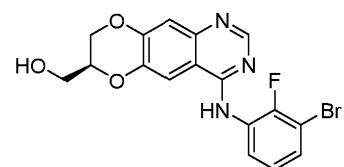
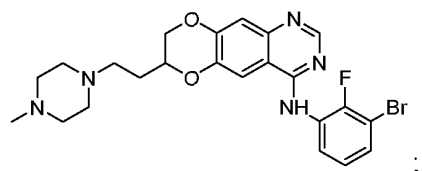
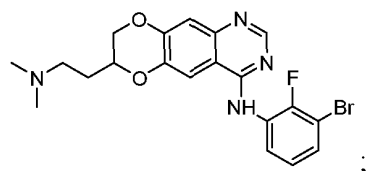
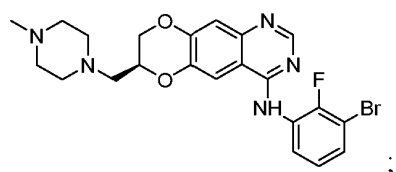
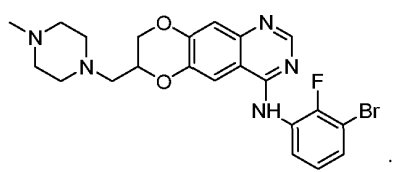
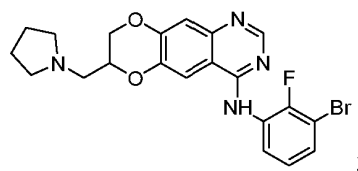
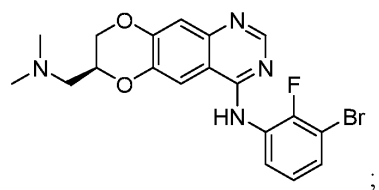
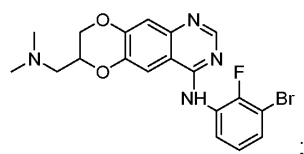
Авторы изобретения, среди прочего, идентифицируют критическую связь между передачей сигналов онкогенов, метаболизмом глюкозы и цитоплазматическим p53, которая может быть использована для комбинированной терапии при GBM и других злокачественных новообразованиях.

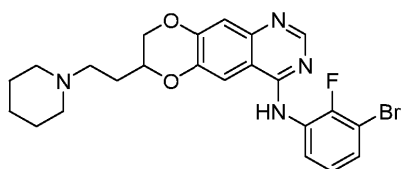
Соединения по изобретению.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены следующие соединения.



044668





или их фармацевтически приемлемая соль.

Способы лечения.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака, который можно лечить ингибированием EGFR, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении рака, количества соединения по изобретению. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак груди, рак сердца, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, фибросаркому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы, позвоночника и шеи, саркому Капоши, рак почки, лейкемию, рак печени, лимфому, меланому, множественную миелому, рак поджелудочной железы, рак полового члена, рак половых клеток яичек, карциному тимомы, карциному тимуса, рак легких, рак яичников или рак простаты. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиому, астроцитому или глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому. В определенных вариантах осуществления способ снижает пролиферацию раковых клеток.

Типы и стадии глиом.

Первичные злокачественные опухоли головного мозга представляют собой опухоли, которые начинаются в головном или спинном мозге и называются глиомами. Глиомы не являются особым типом рака, это термин, используемый для описания опухолей, происходящих из глиальных клеток. Примеры первичных злокачественных опухолей головного мозга включают астроцитомы, пилоцитарные астроцитомы, плеоморфные ксантоастроцитомы, диффузные астроцитомы, анапластические астроцитомы, GBM, ганглиоглиомы, олигодендроглиомы, эпендимомы. Согласно классификации опухолей головного мозга ВОЗ астроцитомы подразделяются на четыре степени в зависимости от основной патологии. Характеристики, которые используются для классификации глиом, включают митозы, клеточную или ядерную атипию, а также пролиферацию и некроз сосудов с псевдоограживающими признаками. Злокачественные (или высокозлокачественные) глиомы включают анапластическую глиому (степень III по ВОЗ), а также мультиформную глиобластому (GBM; IV степень по классификации ВОЗ). Это самые агрессивные опухоли головного мозга с наихудшим прогнозом.

GBM - это наиболее распространенный, сложный, устойчивый к лечению и самый смертоносный тип рака мозга, на который приходится 45% всех случаев рака мозга, при этом ежегодно диагностируется почти 11000 мужчин, женщин и детей. GBM (также известная как астроцитомы 4 степени и мультиформная глиобластома) является наиболее распространенным типом злокачественных первичных опухолей головного мозга. Они чрезвычайно агрессивны по ряду причин. Во-первых, клетки глиобластомы быстро размножаются, так как выделяют вещества, стимулирующие обильное кровоснабжение. У них также есть способность вторгаться и проникать на большие расстояния в здоровый мозг, посылая микроскопические усики опухоли вместе с здоровыми клетками. Известны два типа глиобластом. Первичная GBM - наиболее распространенная форма; они быстро растут и часто рано вызывают симптомы. Вторичные глиобластомы встречаются реже, составляя около 10% всех GBM. Они прогрессируют от диффузной астроцитомы низкой степени злокачественности или анапластической астроцитомы и чаще встречаются у более молодых пациентов. Вторичные GBM преимущественно располагаются в лобной доле и имеют лучший прогноз.

GBM обычно лечат комбинированным мультимодальным планом лечения, включающим хирургическое удаление опухоли, лучевую терапию и химиотерапию. Во-первых, во время операции удаляется как можно больше опухоли. Расположение опухоли в головном мозге часто определяет, насколько ее можно безопасно удалить. После операции лучевая терапия и химиотерапия замедляют рост оставшихся опухолевых клеток. Пероральный химиотерапевтический препарат темозоломид чаще всего используется в течение шести недель, а затем ежемесячно. Другое лекарственное средство, бевацизумаб (известный как Avastin®), также используется во время лечения. Это лекарственное средство блокирует способность опухоли провоцировать кровоснабжение, часто замедляя или даже останавливая рост опухоли.

Также используются новые исследовательские методы лечения, которые могут включать добавление лечения к стандартной терапии или замену одной части стандартной терапии другим лечением, которое может работать лучше. Некоторые из этих методов лечения включают иммунотерапию, такую как иммунотерапия вакцинами, или импульсы электричества с низкой дозой в область мозга, где находится опухоль, и нанотерапию с использованием сферических нуклеиновых кислот (SNA), таких как NU-0129. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются в комбинации с одним или несколькими из вышеупомянутых методов лечения.

Варианты способов и композиций, обсуждаемых в настоящем документе, также рассматриваются

как применимые к другим типам рака, включая, но не ограничиваясь ими, рак легких, рак не ЦНС, рак ЦНС и метастазы в ЦНС, такие как метастазы в головном мозге, лептоменингеальные метастазы, хориоидальные метастазы, метастазы в спинном мозге и другие.

Цитоплазматические стабилизаторы p53.

Авторы изобретения продемонстрировали, что фармакологическая стабилизация p53, например, с помощью проникающей в ЦНС небольшой молекулы, была синергически летальной с ингибированием EGFR-вызванного поглощения глюкозы в первичных моделях GBM, полученных от пациентов. Авторы изобретения впервые продемонстрировали, что нетранскрипционные функции p53 могут играть решающую роль в стимуляции внутреннего апоптоза у пациентов с метаболической реакцией. Соответственно описанные в данном документе способы лечения включают введение цитоплазматического стабилизатора(ов) p53 в комбинации с ингибиторами метаболизма глюкозы. Цитоплазматический стабилизатор(ы) p53 и ингибиторы метаболизма глюкозы можно вводить в одной и той же или в разных композициях, одновременно или последовательно.

Предполагается, что в некоторых вариантах осуществления используется один стабилизатор p53, а в других вариантах осуществления используется более одного стабилизатора p53. Например, сообщается, что комбинация нутлина с АВТ 737 (который связывает BCL-2 и BCL-X<sub>1</sub>) синергически воздействует на баланс проапоптотических и антиапоптотических белков на митохондриальном уровне, тем самым способствуя гибели клеток (Hoe et al., 2014, Nature Reviews, vol. 13, p. 217). Как предполагается в данном документе, цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой любую небольшую молекулу, антитело, пептид, белок, нуклеиновую кислоту или их производные, которые могут непосредственно или опосредованно фармакологически стабилизировать или активировать p53. Стабилизация цитоплазматического p53 приводит к праймированию клеток, таких как раковые клетки, для апоптоза.

Антагонисты MDM2.

Уровни белка p53 в клетках строго контролируются и поддерживаются на низком уровне его негативным регулятором, убиквитин-протеинлигазой E3 MDM2. В вариантах осуществления способов или композиции по настоящему изобретению цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой антагонист/ингибитор MDM2. В некоторых вариантах осуществления антагонист MDM2 представляет собой нутлин. В дополнительных вариантах осуществления нутлин представляет собой нутлин-3 или идасанутлин. В других вариантах осуществления антагонист MDM2 представляет собой RO5045337 (также известный как RG7112), RO5503781, RO6839921, SAR405838 (также известный как MI-773), DS-3032, DS-3032b или AMG-232 или любой другой ингибитор MDM2.

Другие соединения в рамках существующих способов, известных для связывания MDM-2, включают Ro-2443, MI-219, MI-713, MI-888, DS-3032b, бензодиазепиндионы (например, TDP521252), сульфонамиды (например, NSC279287), хроменотриазолопиримидин, морфолинон и пиперидиноны (AM-8553), терфенилы, халконы, пиразолы, имидазолы, имидазол-индолы, изоиндолинон, пирролидинон (например, PNX822), приаксон, пиперидины природного происхождения, SAH-8 (скрепленные пептиды) sMTide-02, sMTide-02a (скрепленные пептиды), ATSP-7041 (скрепленный пептид), спиролигомер (имитатор  $\alpha$ -спирали). Другие соединения, которые, как известно, вызывают сворачивание белка MDM2, включают PRIMA-1MET (также известный как APR-246), Argea 102-105, PK083, PK5174, PK5196, PK7088, бензотиазолы, стиктовую кислоту и NSC319726.

Ингибиторы BCL-2.

В дополнительных вариантах осуществления текущих способов или композиций цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор BCL-2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BCL-2 представляет собой, например, антисмысловой олигодезоксинуклеотид G3139, антагонист мРНК SPC2996, венетоклакс (ABT-199), GDC-0199, обатоклакс, паклитаксел, навитоклакс (ABT-263), АВТ-737, NU-0129, S 055746, APG-1252 или любой другой ингибитор BCL-2.

Ингибиторы Bcl-xL.

В других вариантах осуществления способов или композиций по изобретению цитоплазматический стабилизатор p53 представляет собой ингибитор Bcl-xL. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-xL представляет собой, например, WENI 539, АВТ-263, АВТ-199, АВТ-737, сабутоклакс, АТ101, ТW-37, APG-1252, гуммигутовую кислоту или любой другой ингибитор Bcl-xL.

Методы оценки.

Тесты на поглощение глюкозы.

В вариантах осуществления способов и композиций по настоящему изобретению субъект с GBM или раком классифицируется как "пациент с метаболической реакцией" или "пациент без метаболической реакции", т.е. определяется как восприимчивый к ингибиторам метаболизма глюкозы. В определенных вариантах осуществления изобретения классификация субъекта проводится до применения в отношении субъекта лечения, включающего ингибитор метаболизма глюкозы и цитоплазматический стабилизатор p53. Соответственно настоящее описание предоставляет способы оценки рака, классификации субъекта, определения предрасположенности субъекта к лечению, включающему анализ метаболизма глюкозы, гликолиза или поглощения глюкозы. Способы классификации субъекта как пациента с метаболической реакцией подробно описаны в примере 1. Способы мониторинга гликолиза и поглощения глю-

козы предоставлены T. TeSlaa, M.A. Teitell, 2014, *Methods in Enzymology*, vol. 542, p. 92-114, включенный в данный документ в качестве ссылки.

Гликолиз - это внутриклеточное биохимическое превращение одной молекулы глюкозы в две молекулы пирувата с одновременным образованием двух молекул АТФ. Пируват является промежуточным продуктом метаболизма с несколькими потенциальными метаболическими путями, включая вход в цикл трикарбоновой кислоты (ТСА) в митохондриях для выработки NADH и FADH<sub>2</sub>. Альтернативно пируват может быть преобразован в лактат в цитозоле лактатдегидрогеназой с одновременным восстановлением NAD<sup>+</sup> из NADH. Увеличенный поток за счет гликолиза поддерживает пролиферацию раковых клеток, обеспечивая, например, дополнительную энергию в форме АТФ, а также производных глюкозы промежуточных продуктов метаболизма для биосинтеза нуклеотидов, липидов и белков. Warburg (*Oncologia*, 1956, 9(2):75-83) впервые заметил, что пролиферирующие опухолевые клетки усиливают аэробный гликолиз, превращение глюкозы в лактат в присутствии кислорода, в отличие от незлокачественных клеток, которые в основном дышат при наличии кислорода. Этот митохондриальный обход, называемый эффектом Варбурга, происходит в быстро пролиферирующих клетках, включая раковые клетки, активированные лимфоциты и плюрипотентные стволовые клетки. Эффект Варбурга использовался в клинических диагностических тестах, в которых используется позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) для выявления повышенного клеточного поглощения фторированных аналогов глюкозы, таких как <sup>18</sup>F-дезоксиглюкоза.

Таким образом, гликолиз представляют собой мишень для терапевтических и диагностических методов. В контексте существующих способов измерения поглощения глюкозы и выведения лактата злокачественными клетками может быть полезным для обнаружения сдвигов в катаболизме глюкозы и/или восприимчивости к ингибиторам метаболизма глюкозы. Обнаружение таких сдвигов важно для способом лечения GBM, способов снижения риска неэффективной терапии, способов снижения шансов на выживание опухоли. Для целей настоящего изобретения <sup>18</sup>F-дезоксиглюкоза ПЭТ в некоторых вариантах осуществления служит быстрым неинвазивным функциональным биомаркером для прогнозирования чувствительности к активации p53. Этот неинвазивный анализ может быть особенно ценным для злокачественных опухолей головного мозга, где оценка фармакокинетики/фармакодинамики чрезвычайно трудна и непрактична. В некоторых случаях протоколы отсроченной визуализации (41) и параметрические карты ответа (PRM) со слиянием ЯМР могут быть полезны для количественной оценки изменений в поглощении опухолями <sup>18</sup>F-FDG (42).

В определенных аспектах способы могут относиться к измерению поглощения глюкозы и выведения лактата. Для клеток в культуре гликолитический поток может быть определен количественно путем измерения поглощения глюкозы и выведения лактата. Поглощение глюкозы клеткой происходит через переносчиков глюкозы (Glut1-Glut4), тогда как выведение лактата через переносчиков монокарбоксилата (MCT1-MCT4) на клеточной мембране.

Внеклеточная глюкоза и лактат.

Методы определения поглощения глюкозы и выведения лактата включают, например, набор внеклеточной глюкозы или лактата, внеклеточный биоанализатор, измерение ECAR, поглощение [3H]-2-DG или [14C]-2-DG, поглощение <sup>18</sup>F-DG или поглощение 2-NBDG.

Имеются коммерчески доступные наборы и инструменты для количественного определения уровней глюкозы и лактата в средах для культивирования клеток. Наборы методов обнаружения обычно колориметрические или флуориметрические и совместимы со стандартным лабораторным оборудованием, таким как спектрофотометры. Анализаторы BioProfile (такие как Nova Biomedical) или биохимические анализаторы (такие как, например, YSI Life Sciences) могут измерять уровни как глюкозы, так и лактата в средах для культивирования клеток. GlucCell (Cesco BioProducts) может измерять только уровни глюкозы в средах для культивирования клеток. Хотя каждый коммерческий метод имеет свой протокол обнаружения, набор питательных сред для анализа одинаков.

Скорость внеклеточного закисления.

Гликолиз также можно определить путем измерения скорости внеклеточного закисления (ECAR) окружающей среды, которая в основном связана с выведением молочной кислоты в единицу времени после ее преобразования из пирувата. Анализатор внеклеточного потока (XF) Seahorse (Seahorse Bioscience) - это инструмент для измерения гликолиза и окислительного фосфорилирования (через потребление кислорода) одновременно в одних и тех же клетках.

Поглощение аналога глюкозы.

Определенные варианты осуществления способов по настоящему изобретению включают использование аналогов глюкозы. Как известно специалисту в данной области техники, для определения скорости поглощения глюкозы клетками меченую изоформу глюкозы можно добавить в среду для культивирования клеток и затем измерить в клетках через заданный период времени. Примеры типов аналогов глюкозы для этих исследований включают, но не ограничиваются ими, радиоактивные аналоги глюкозы, такие как 2-дезоксид-[1,2-<sup>3</sup>H]-глюкоза, 2-дезоксид-D-[1-<sup>14</sup>C]-глюкоза, или 2-дезоксид-2-(<sup>18</sup>F)-фтор-D-глюкоза (<sup>18</sup>F-DG), или флуоресцентные аналоги глюкозы, такие как 2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диаксол-4-ил)амино]-2-дезоксиглюкоза (2-NBDG). Для измерения поглощения радиоактивного аналога глюкозы требуется сцинтилляционный счетчик, тогда как поглощение 2-NBDG обычно измеряется с помощью

проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления поглощение глюкозы измеряется путем поглощения радиоактивно меченной глюкозой 2-дезоксид-2-[фтор-18] фтор-D-глюкозой ( $^{18}\text{F}$ -FDG). В дополнительных вариантах осуществления обнаружение  $^{18}\text{F}$ -FDG осуществляется с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения биопсия берется из опухоли GBM. Подробное описание примера измерения  $^{18}\text{F}$ -FDG приведено в примерах ниже.

В определенных аспектах способы могут относиться к сравнению поглощения глюкозы биологическим образцом, таким как образец опухоли, с контролем. Увеличение или уменьшение кратности может быть по меньшей мере или не более 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100- или более или любой диапазон, получаемый из них. В качестве альтернативы, различия в выражении между образцом и эталоном могут быть выражены как процентное уменьшение или увеличение, например как по меньшей мере или максимум 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% различие или любой диапазон, получаемый из них.

Другими способами выражения относительных уровней экспрессии являются нормализованные или относительные числа, такие как 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, или любой диапазон, получаемый из них. В некоторых вариантах осуществления уровни могут относиться к контролю.

Алгоритмы, такие как программы взвешенного голосования, могут использоваться для облегчения оценки уровней биомаркеров. Кроме того, другие клинические данные могут быть объединены с тестом на основе биомаркеров, чтобы снизить риск ложных оценок. В некоторых вариантах осуществления могут быть рассмотрены другие цитогенетические оценки.

#### Определения.

Если в настоящем документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, должны иметь значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с химическими методами, методиками культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, клеточной и онкологической биологии, нейробиологии, нейрохимии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, фармакологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области.

Способы и методики настоящего описания, как правило, выполняются, если не указано иное, в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.", W.H. Freeman & Co., N.Y. (1999); и Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Химические термины, используемые в настоящем документе, если здесь не указано иное, используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как показано в "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все вышеперечисленное и любые другие публикации, патенты и опубликованные патентные заявки, упомянутые в данной заявке, специально включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая его конкретные определения, будет иметь преимущественную силу.

Термин "агент" используется в настоящем документе для обозначения химического соединения (такого как органическое или неорганическое соединение, смесь химических соединений), биологической макромолекулы (такой как нуклеиновая кислота, антитело, включая их части, а также гуманизированные, химерные и человеческие антитела и моноклональные антитела, белок или его часть, например, пептид, липид, углевод), или экстракт, полученный из биологических материалов, таких как клетки бактерий и клетки или ткани растений, грибов или животных (особенно млекопитающих). Агенты включают, например, агенты, структура которых известна, и агенты, структура которых неизвестна. Способность таких агентов ингибировать AR или способствовать деградации AR может сделать их пригодными в качестве "терапевтических агентов" в способах и композициях по настоящему изобретению.

"Пациент", "субъект" или "индивидуум" используются взаимозаменяемо и относятся к человеку или животному, не являющемуся человеком. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, сельскохозяйственные животные (включая коров, свиней и т.д.), домашние животные (например, собаки, кошки и т.д.) и грызуны (например, мыши и крысы).



"Лечение" состояния или пациента означает принятие мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. В контексте настоящего документа и как хорошо известно в данной области, "лечение" представляет собой подход для получения благоприятных или желательных результатов, включая клинические результаты. Полезные или желательные клинические результаты могут включать, но не ограничиваются ими, ослабление или улучшение одного или нескольких симптомов или состояний, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, предотвращение распространения заболевания, задержку или замедление развития заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемые или не обнаруживаемые. "Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится.

Термин "предотвращение" является общепризнанным в данной области техники, и при использовании в отношении состояния, такого как местный рецидив (например, боль), заболевания, такого как рак, синдромного комплекса, такого как сердечная недостаточность, или любого другого медицинского состояния, хорошо понимается в данной области техники и включает введение композиции, которая уменьшает частоту или замедляет появление симптомов медицинского состояния у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает композицию. Таким образом, профилактика рака включает, например, уменьшение количества обнаруживаемых раковых образований в популяции пациентов, получающих профилактическое лечение по сравнению с нелеченой контрольной популяцией, и/или задержку появления выявляемых раковых образований в леченной популяции по сравнению с нелечеными контрольными популяциями, например, статистически и/или клинически значимым количеством.

"Применение" или "введение" вещества, соединения или агента субъекту может быть осуществлено с использованием одного из множества способов, известных специалистам в данной области техники. Например, соединение или агент можно вводить внутривенно, артериально, внутривожно, внутримышечно, внутривентриально, подкожно, через глаза, сублингвально, перорально (путем приема внутрь), интраназально (путем ингаляции), внутриспинально, интрацеребрально и трансдермально (путем абсорбции, например, через кожный проток). Соединение или агент также можно соответствующим образом вводить с помощью перезаряжаемых или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например пластырей и насосов, или составов, которые обеспечивают пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

Подходящие способы введения вещества, соединения или агента субъекту также будут зависеть, например, от возраста и/или физического состояния субъекта и химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимости, усвояемости, биодоступности, стабильности и токсичности). В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение или агент вводят перорально, например, субъекту путем приема внутрь. В некоторых вариантах осуществления перорально вводимое соединение или агент находится в составе с пролонгированным или замедленным высвобождением или вводится с использованием устройства для такого медленного или пролонгированного высвобождения.

Используемое в данном документе выражение "совместное введение" относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических агентов, так что второй агент вводят, в то время как ранее введенный терапевтический агент все еще эффективен в организме (например, два агента являются одновременно эффективными у пациента, что может включать синергетическое действие двух агентов). Например, различные терапевтические соединения могут вводиться либо в одной и той же композиции, либо в отдельных композициях, одновременно или последовательно. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических агентов.

"Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или агента представляет собой количество лекарственного средства или агента, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый терапевтический эффект. Полный терапевтический эффект необязательно возникает при введении одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. Точное эффективное количество, необходимое для субъекта, будет зависеть, например, от размера, состояния здоровья и возраста субъекта, а также от характера и степени тяжести состояния, подвергаемого лечению, такого как рак или MDS. Специалист может легко определять эффективное количество для данной ситуации путем рутинных экспериментов.

Используемый в настоящем документе термин "модулировать" включает ингибирование или подавление функции или активности (такой как пролиферация клеток), а также усиление функции или активности.

Фраза "фармацевтически приемлемый" признана в данной области техники. В определенных вариантах осуществления термин включает композиции, вспомогательные вещества, адъюванты, полимеры и другие материалы и/или лекарственные формы, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соот-

ношением пользы/риска.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" или "соль" используется в настоящем документе для обозначения соли присоединения кислоты или соли присоединения основания, которая подходит для лечения пациентов или совместима с ним.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты" означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любых основных соединений по изобретению. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя соляную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как *p*-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут быть образованы моно- или дикислотные соли, и такие соли могут существовать в гидратированной, сольватированной или практически безводной форме. Как правило, соли присоединения кислоты соединений по изобретению более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно демонстрируют более высокие температуры плавления по сравнению с их формами свободного основания. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники. Другие фармацевтически неприемлемые соли, например, оксалаты, могут быть использованы, например, для выделения соединений по изобретению для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

Термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения основания", как он используется в настоящем документе, означает любую нетоксичную соль присоединения органического или неорганического основания любых кислотных соединений по изобретению, или любых их промежуточных соединений. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя гидроксид лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники.

Многие из соединений, полезных в способах и композициях данного описания, имеют по меньшей мере один стереогенный центр в своей структуре. Этот стереогенный центр может присутствовать в конфигурации R или S, указанные обозначения R и S используются в соответствии с правилами, описанными в *Pure Appl. Chem.* (1976), 45, 11-30. В описании рассматриваются все стереоизомерные формы, такие как энантиомерные и диастереоизомерные формы соединений, солей, пролекарств или их смесей (включая все возможные смеси стереоизомеров). См., например, WO 01/062726.

Кроме того, некоторые соединения, которые содержат алкенильные группы, могут существовать в виде Z (*zusammen*, вместе) или E (*entgegen*, напротив) изомеров. В каждом случае описание включает как смесь, так и отдельные индивидуальные изомеры.

Некоторые из соединений могут также существовать в таутомерных формах. Такие формы, хотя они явно не указаны в формулах, описанных в настоящем документе, предназначены для включения в объем настоящего описания.

"Пролекарство" или "фармацевтически приемлемое пролекарство" относится к соединению, которое метаболизируется, например, гидролизуется или окисляется, в хозяине после введения с образованием соединения по настоящему изобретению. Типичные примеры пролекарств включают соединения, которые имеют биологически лабильные или расщепляемые (защитные) группы на функциональном фрагменте активного соединения. Пролекарства включают соединения, которые можно окислять, восстанавливать, аминировать, дезаминировать, гидроксिलировать, дегидроксिलировать, гидролизовать, дегидролизовать, алкилировать, дезалкилировать, ацилировать, дезацилировать, фосфорилировать или дефосфорилировать для получения активного соединения. Примеры пролекарств, использующих сложный эфир или фосфорамидат в качестве биологически лабильных или расщепляемых (защитных) групп, раскрыты в патентах США 6875751, 7585851 и 7964580, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Пролекарства по настоящему изобретению метаболизируются с образованием соединения по изобретению. Настоящее изобретение включает в свой объем пролекарства соединений, описанных в настоящем документе. Обычные процедуры выбора и приготовления подходящих пролекарств описаны, например, в "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" при использовании в настоящем документе означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый фильтр, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, пригодный для приготовления лекарственного средства для медицинского или терапевтического применения.

Используемые здесь термины "Log растворимости", "LogS" или "logS" используются в данной области для количественного определения растворимости соединения в воде. Растворимость соединения в воде значительно влияет на его характеристики всасывания и распределения. Низкая растворимость час-

то сопровождается плохой абсорбцией. Значение LogS представляет собой логарифм с отделенной единицей (основание 10) растворимости, измеренной в моль/литр.

Фармацевтические композиции.

Композиции и способы по настоящему изобретению могут применяться для лечения индивидуума, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, не являющееся человеком. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединения по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или инъекционные органические сложные эфиры. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, особенно для инвазивных путей введения (т.е. путей, таких как инъекция или имплантация, которые обеспечивают преодолеваящий перенос или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор не содержит пирогенов или практически не содержит пирогенов. Вспомогательные вещества могут быть выбраны, например, для осуществления отсроченного высвобождения агента или для избирательного нацеливания на одну или более клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в форме единичной дозы, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемую капсулу и желатиновую капсулу), гранула, лиофильный препарат для разведения, порошок, раствор, сироп, суппозиторий, инъекция или т.п. Композиция также может присутствовать в системе трансдермальной доставки, например в виде пластыря. Композиция также может присутствовать в растворе, подходящем для местного применения, таком как лосьон, крем или мазь.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, для стабилизации, увеличения растворимости или увеличения абсорбции соединения, такого как соединение по изобретению. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или вспомогательные вещества. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически приемлемый агент, зависит, например, от пути введения композиции. Препарат или фармацевтическая композиция могут быть самоэмульгирующей системой доставки лекарств или системой лекарственной доставки с самопроизвольным формированием микроэмульсии. Фармацевтическая композиция (препарат) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, которая может включать, например, соединение по изобретению. Например, липосомы, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в изготовлении и применении.

Фраза "фармацевтически приемлемый" применяется в настоящем документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках рационального медицинского решения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению пользы/риска.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами состава и не причиняет вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) апирогенная вода; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Фармацевтическую композицию (препарат) можно вводить субъекту любым из ряда способов введения, включая, например, пероральное введение (например, капли, как в водных или неводных растворах или суспензиях, таблетки, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык); всасывание через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); подкожно; трансдермально (например, в виде пластыря, нанесенного на ко-

жу); и местно (например, в виде крема, мази или спрея, нанесенных на кожу). Соединение также может быть составлено для ингаляции. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение может быть просто растворено или суспендировано в стерильной воде. Подробности подходящих путей введения и подходящих для них композиций можно найти, например, в патентах США № 6110973, 5763493, 5731000, 5541231, 5427798, 5358970 и 4172896, а также в цитированных в них патентах.

Составы можно удобно предоставлять в стандартной дозированной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от организма, который лечат, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтический эффект. В целом из 100% это количество будет варьировать от около 1% до около 99% активного ингредиента, предпочтительно от около 5% до около 70%, наиболее предпочтительно от около 10% до около 30%.

Способы приготовления этих составов или композиций включают стадию объединения активного соединения, такого как соединение изобретения, с носителем и, необязательно, одним или более дополнительными ингредиентами. Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения настоящего изобретения с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или ими обоими, а затем при необходимости формованием продукта.

Составы по изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), крахмальных капсул, пилюль, таблеток, леденцов (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и гуммиарабика или трагаканта), лиофильных препаратов, порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или в виде средств для полоскания рта и т.п., каждая из которых содержит заранее определенное количество соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения также можно вводить в виде боллуса, электуария или пасты.

Для приготовления твердых дозированных форм для перорального введения (капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т.п.) активный ингредиент смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или любым из следующего: (1) наполнители или добавки, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие растворение агенты, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразующие агенты, такие как модифицированные и немодифицированные циклодекстрины; и (11) красители. В случае капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблеток и пилюль фармацевтические композиции также могут содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких эксципиентов как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетку можно получать путем прессования или формовки необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связующего (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегранта (например, натрий гликолята крахмала или сшитой натрий карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования в подходящем аппарате смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций, такие как драже, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, могут быть необязательно с насечкой или приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтики. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение в нем активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, чтобы обеспечить желаемый профиль высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Они могут быть стерилизованы, например, фильтрованием через задерживающий бактерии фильтр или включением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворить в стерильной воде или в некоторой другой стерильной инъекционной среде непосред-

ственно перед использованием. Эти композиции также могут, необязательно, содержать замутнители и могут представлять собой композицию, из которой они высвобождают только активный(ые) ингредиент(ы) или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с поддержкой. Примеры композиций встраивания, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме, если это уместно, с одним или более вышеописанными вспомогательными веществами.

Жидкие лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, лиофильные препараты для разведения, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот с сорбитаном и их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции для ухода за полостью рта могут также включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать в дополнение к активному соединению эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и аэрозоли могут содержать, в дополнение к активному соединению, эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамидов, или смеси этих веществ. Аэрозоли могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения настоящего изобретения в организм. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены путем растворения или диспергирования активного соединения в подходящей среде. Усилители абсорбции также могут быть использованы для увеличения потока соединения через кожу. Скорость такого потока может контролироваться либо предоставлением регулирующей скорости мембраны, либо диспергированием соединения в полимерной матрице или геле.

Фразы "парентеральное введение" и "введенный парентерально", используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интратермальную инъекцию и инфузию. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, содержат одно или более активных соединений в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть разведены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты, растворимые вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующими или загущающими агентами.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях изобретения, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроор-

ганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть вызвано включением агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для пролонгирования действия лекарственного средства, желательно замедлять абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществлять посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы осуществляют путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Инъекционные депо-формы получают путем формирования микрокапсулированных матриц расматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения лекарства можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэферы) и поли(ангидриды). Депо-инъекционные составы также готовят путем заключения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Для использования в способах по изобретению активные соединения могут быть даны сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно от 0,5 до 90%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения могут также обеспечиваться перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и испытаны *in vivo* различные полимерные устройства с медленным высвобождением для контролируемой доставки лекарств, включая белковые биофармацевтические препараты. Различные биосовместимые полимеры (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, могут быть использованы для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном целевом месте.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсического эффекта для пациента.

Выборный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения или комбинации соединений или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого(ых) соединения(й), продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с применяемыми конкретным(ыми) соединением(ями), возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в данной области медицины.

Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области, может легко определять и назначать терапевтически эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать прием доз фармацевтической композиции или соединения с уровнем ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается концентрация соединения, которая является достаточной для достижения необходимого терапевтического эффекта. Обычно считается, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от веса, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать, помимо прочего, тяжесть состояния пациента, расстройство, которое лечат, стабильность соединения и, если желательно, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением по настоящему изобретению. Большая общая доза может быть доставлена путем многократного введения агента. Способы определения эффективности и дозировки известны специалистам в данной области техники (Isselbacher et al. (1996), Harrison's Principles of Internal Medicine 13 ed., 1814-1882, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

В общем подходящая суточная доза активного соединения, используемого в композициях и способах изобретения, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения активное соединение может вводиться два или три раза в день. В предпочтительных вариантах осуществления активное соединение будет вводиться один раз в день.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности людей; и другие млекопитающие, такие как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, кошки и собаки; птицы; и домашние животные в целом.

В определенных вариантах осуществления соединения изобретения могут вводиться отдельно или совместно с терапевтическим агентом другого типа.

Настоящее описание включает использование фармацевтически приемлемых солей соединений по изобретению в композициях и способах по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли по настоящему изобретению включают, помимо прочего, соли алкила, диалкила, триалкила или тетраалкиламмония. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, L-аргинин, бенентамин, бензатин, бетаин, гидроксид кальция, холин, динол, диэтанолламин, диэтиламин, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламин, этилендиамин, N-метилглюкамин, гидрабамин, 1H-имидазол, литий, L-лизин, магний, 4-(2-гидроксиэтил)морфолин, пиперазин, калий, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидин, натрий, триэтанолламин, трометамин и соли цинка. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные соли по настоящему изобретению включают, помимо прочего, соли Na, Ca, K, Mg, Zn или других металлов. В некоторых вариантах предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, 2-оксоглутаровую кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, уксусную кислоту, адипиновую кислоту, l-аскорбиновую кислоту, l-аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, (+)-камфорную кислоту, (+)-камфор-10-сульфокислоту, каприновую кислоту (декановая кислота), капроновую кислоту (гексановая кислота), каприловую кислоту (октановая кислота), угольную кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, цикламиную кислоту, додецилсульфоновую кислоту, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, d-глюкогептоновую кислоту, d-глюконовую кислоту, d-глюкуроновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, бромистоводородную кислоту, соляную кислоту, изомасляную кислоту, молочную кислоту, лактобионовую кислоту, лауриновую кислоту, малеиновую кислоту, l-яблочную кислоту, малоновую кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, памовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, l-пироглутаминовую кислоту, салициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, l-винную кислоту, тиоциановую кислоту, p-толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту и соли ундециленовой кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот также могут существовать в виде различных сольватов, таких как вода, метанол, этанол, диметилформамид и т.п. Могут быть также приготовлены смеси таких сольватов. Источником такого сольвата может быть растворитель кристаллизации, принадлежащий к растворителю для приготовления или кристаллизации или случайный для такого растворителя.

В композициях также могут присутствовать увлажняющие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивные агенты, покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металлохелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

### Примеры

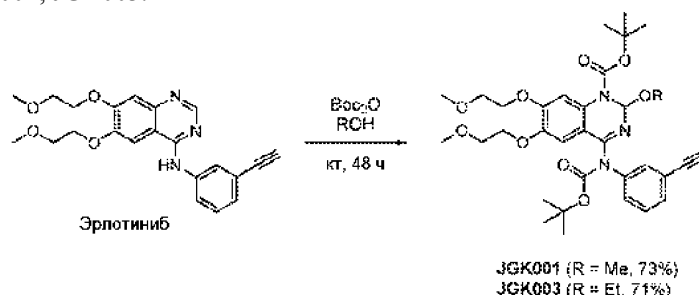
Теперь изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Получение иллюстративных соединений серии JGK.

Общие процедуры. Соединения серии JGK могут быть получены способами, описанными ниже, или любым другим подходящим способом. Соединения серии JGK иногда упоминаются в данном документе с префиксом JCN. Все реакции обычно проводили в инертной атмосфере аргона. Если не указано иное, материалы были получены от коммерческих поставщиков и использовались без очистки. Все растворители были очищены и высушены стандартными методами непосредственно перед использованием. ТГФ и Et<sub>2</sub>O были недавно перегнаны из натрия и бензофенона. Метиленхлорид, толуол и бензол очищали нагреванием с обратным холодильником с CaH<sub>2</sub>. Реакции проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (Kieselgel 60 F254, Merck). Пятна были обнаружены при просмотре в УФ-свете и окрашивании с помощью обугливания после погружения в раствор p-анизальдегида или раствор фосфорномолибденовой кислоты. При водной обработке все органические растворы сушили над безводным сульфатом маг-

ния и фильтровали перед роторным испарением при давлении водяного насоса. Неочищенные соединения очищали колоночной хроматографией на силикагеле (SilicaFlash P60, 230-400 меш, SiliCycle Inc). Спектры ЯМР протонов ( $^1\text{H}$ ) и углерода ( $^{13}\text{C}$ ) получали на спектрометре Bruker AV 400 (400/100 МГц) или Bruker AV500 (500/125 МГц). Химические сдвиги представлены в единицах ppm с  $\text{Me}_4\text{Si}$  или  $\text{CHCl}_3$  в качестве внутреннего стандарта. Шаблоны расщепления обозначаются: s, синглет; d, дублет; t, триплет; m, мультиплет; b, широкий. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения были получены с использованием Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с источником IonSense ID-CUBE DART.

Получение JGK001, JGK003.



**JGK001.** В раствор эрлотиниба (134 мг, 0,3406 ммоль) в безводном метаноле (5,0 мл) добавляли дитрет-бутилкарбонат (228 мг, 1,7029 ммоль) одной порцией при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 48 ч и концентрировали в вакууме. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл) и  $\text{EtOAc}$  (30 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $2 \times 30$  мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , 3/1) с получением JGK001 (156 мг, 73%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,86 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,20-7,23 (м, 2H), 7,16 (тд,  $J=1,2$ , 7,6 Гц, 1H), 7,09 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,16-4,25 (м, 4H), 3,80 (т,  $J=5,2$  Гц, 2H), 3,77 (т,  $J=5,2$  Гц, 2H), 3,45 (с, 3H), 3,44 (с, 3H), 3,44 (с, 3H), 3,03 (с, 1H), 1,55 (с, 9H), 1,11 (с, 9H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152,1, 151,5, 149,2, 148,8, 145,7, 142,7, 130,6, 128,9, 127,4, 125,3, 122,6, 121,5, 114,7, 111,4, 108,0, 90,7, 83,7, 83,3, 82,9, 76,8, 70,9, 70,7, 68,8, 68,7, 59,2, 59,1, 55,0, 28,2, 27,3;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 626,3061 [расч. для  $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_9$  625,2993].

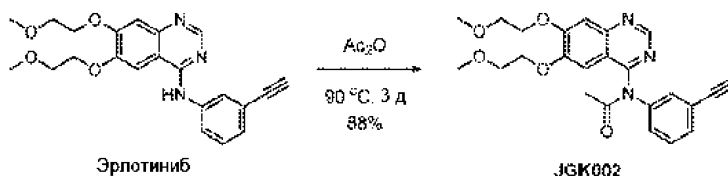
**JGK003.** В раствор эрлотиниба (101 мг, 0,2567 ммоль) в безводном этаноле (2,6 мл) добавляли дитрет-бутилкарбонат (172 мг, 1,2836 ммоль) одной порцией при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 48 ч и концентрировали в вакууме. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл) и  $\text{EtOAc}$  (30 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $2 \times 30$  мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , 3/1) с получением JGK003 (117 мг, 71%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,86 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,21-7,24 (м, 2H), 7,16 (д,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,10 (д,  $J=7,6$  Гц, 1H), 4,17-4,25 (м, 4H), 3,61-3,82 (м, 6H), 3,46 (с, 3H), 3,45 (с, 3H), 3,02 (с, 1H), 1,55 (с, 9H), 1,23 (т,  $J=6,8$  Гц, 3H), 1,12 (с, 9H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152,0, 151,4, 149,2, 148,9, 145,5, 143,0, 130,8, 128,8, 127,3, 125,3, 122,5, 121,7, 114,7, 111,3, 107,9, 89,3, 83,7, 83,2, 82,8, 76,7, 70,9, 70,7, 68,8, 68,6, 63,0, 59,2, 59,1, 28,2, 27,4, 14,6;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 640,3211 [расч. для  $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_9$  639,3150].

Получение JGK002.



К твердому эрлотинибу (165 мг, 0,4194 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл). После нагревания при  $90^\circ\text{C}$  (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (20 мл) и разбавляли с помощью  $\text{EtOAc}$  (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $2 \times 30$  мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , от 1/1 до 1/3) с получением JGK002 (161 мг, выделенный выход 88%).

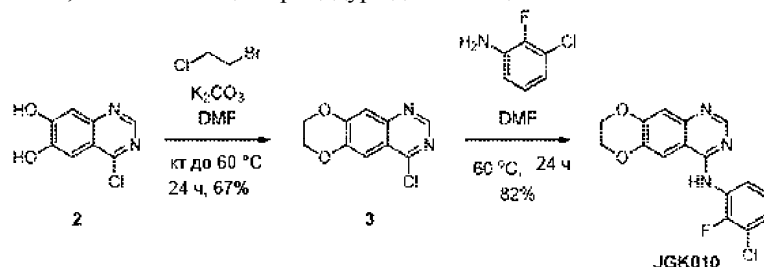


$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,06 (с, 1H), 7,45 (т,  $J=1,6$  Гц, 1H), 7,37-7,39 (м, 2H), 7,36 (с, 1H), 7,30-7,34 (м, 1H), 7,15 (с, 1H), 4,32 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 4,16 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,86 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,79 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,46 (с, 3H), 3,45 (с, 3H), 3,06 (с, 1H), 2,14 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,5, 158,8, 156,1, 153,5, 151,1, 150,8, 141,0, 130,9, 130,3, 129,3, 127,5, 123,4, 117,2, 107,9, 103,1, 82,4, 78,4, 70,6, 70,3, 68,9, 68,7, 59,3, 59,3, 23,7;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 436,1811 [рассч. для  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$  435,1788].

Получение JGK010, JGK032. Общая процедура для замещения аналогами анилина.



Циклизация. В раствор диола 2 (530 мг, 2,6959 ммоль) в DMF (13,5 мл, 0,2 М) добавляли одной порцией карбонат калия (1490 мг) с последующим последовательным добавлением по каплям 1-бром-2-хлорэтана (1,3 мл) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После нагревания при 60°C (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, гасили с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (50 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 6/1 до 3/1) с получением слитого хлорхиназолина 3 (404 мг, 67%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,84 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,47 (с, 1H), 4,43-4,45 (м, 2H), 4,39-4,42 (м, 2H) [известное соединение; Chilin, A. et al., J. Med. Chem., 2010, 53, 1862-1866].

JGK010. В раствор слитого хлорхиназолина 3 (114 мг, 0,5120 ммоль) в DMF (2,6 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,10 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 60°C (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли с помощью  $\text{Et}_2\text{O}$  (30,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью  $\text{Et}_2\text{O}$  (2×50 мл) и собирали с получением JGK010 (140 мг, 82%).

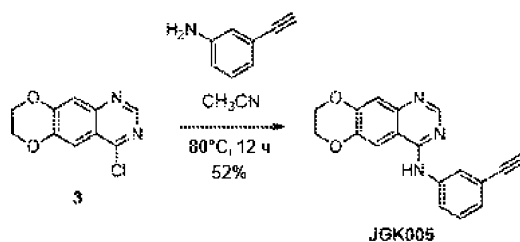
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,59 (дд,  $J=3,2, 6,8, 6,8$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 7,10-7,18 (м, 2H), 4,38-4,43 (м, 4H);

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  11,78 (с, 1H), 8,79 (с, 1H), 8,45 (с, 1H), 7,62 (т,  $J=7,0$  Гц, 1H), 7,50 (т,  $J=7,0$  Гц, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,34 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,46-4,53 (м, 2H), 4,40-4,52 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  159,8, 154,0, 152,2, 149,9, 145,7, 135,2, 129,9, 128,1, 126,4, 125,8, 120,9, 111,3, 108,1, 105,8, 65,5, 64,6;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 332,0551 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClFN}_3\text{O}_2$  331,0518].

Получение JGK005.



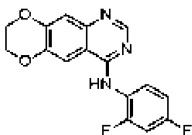
В раствор слитого хлорхиназолина 3 (14 мг, 0,0628 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2,0 мл) по каплям добавляли 3-этиниланилин (0,05 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 80°C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, 3/1) с получением JGK005 (10 мг, 52%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  9,45 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 8,04-8,05 (м, 2H), 7,87-7,90 (м, 1H), 7,34 (т,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,14-7,16 (м, 2H), 4,35-4,39 (м, 4H), 4,14 (с, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  156,8, 153,3, 149,5, 146,5, 144,1, 140,2, 129,3, 126,7, 124,9, 122,7, 122,1, 113,0, 110,4, 108,8, 84,0, 80,9, 64,9, 64,6;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 304,1079 [рассч. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$  303,1002].

JGK025.



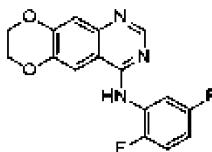
JGK025

Получение JGK025 проводили согласно общей процедуре; JGK025 (25%).

 $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  11,30 (с, 1H), 8,73 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,51-7,58 (м, 1H), 7,41-7,48 (м, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,17-7,23 (м, 1H), 4,44-4,50 (м, 2H), 4,39-4,44 (м, 2H);

 $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, MeOD)  $\delta$  161,6 ( $J=245,9$  Гц), 160,0, 157,6 ( $J=249,6$  Гц), 152,1, 150,1, 145,6, 135,4, 130,4, 121,4, 112,4, 110,9, 108,1, 108,1, 105,4, 65,5, 64,6;
МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 316,0890 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$  315,0813].

JGK026.



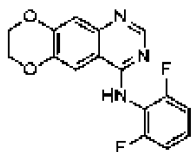
JGK026

Получение JGK026 проводили согласно общей процедуре; JGK026 (22%).

 $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  11,09 (с, 1H), 8,74 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,39-7,51 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 7,23-7,29 (м, 1H), 4,45-4,49 (м, 2H), 4,40-4,44 (м, 2H);

 $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, MeOD)  $\delta$  159,8, 158,1 ( $J=239,6$  Гц), 153,7 ( $J=243,2$  Гц), 152,1, 150,1, 145,7, 135,7, 126,0, 117,9, 117,8, 116,0, 110,9, 108,2, 106,2, 65,5, 64,6;
МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 316,0893 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$  315,0813].

JGK027.



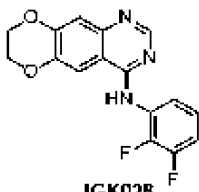
JGK027

Получение JGK027 проводили согласно общей процедуре; JGK027 (6%).

 $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  11,23 (bs, 1H), 8,75 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,46-7,55 (м, 1H), 7,29 (т,  $J=8,1$  Гц, 2H), 4,46-4,50 (м, 2H), 4,40-4,46 (м, 2H);

 $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, MeOD)  $\delta$  163,6, 160,7, 160,4, 158,4, 152,5, 151,5, 146,2, 130,6, 115,6, 113,5, 113,4, 111,9, 109,3, 108,2, 66,2, 65,3;
МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 316,0889 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$  315,0813].

JGK028.



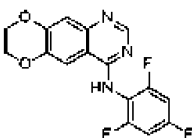
JGK028

Получение JGK028 проводили согласно общей процедуре; JGK028 (41%).

 $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, MeOD)  $\delta$  8,64 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,31-7,38 (м, 2H), 7,24-7,31 (м, 2H), 4,50-4,55 (м, 2H), 4,44-4,50 (м, 2H);

 $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, MeOD)  $\delta$  160,1, 152,8, 150,9 ( $J=245,6$  Гц), 149,0, 146,2, 145,9 ( $J=249,7$  Гц), 134,6, 126,0, 124,0, 123,1, 116,2, 109,8, 107,8, 105,0, 65,2, 64,2;
МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 316,0884 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$  315,0813].

JGK029.



JGK029

Получение JGK029 проводили согласно общей процедуре; JGK029 (52%).

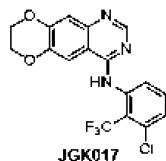
 $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, MeOD)  $\delta$  8,60 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 7,07-7,13 (м, 2H), 4,50-4,53 (м,

2H), 4,44-4,48 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  161,7, 160,3, 158,6, 158,1, 153,2, 150,3, 144,4, 143,7, 117,2, 113,8, 113,0, 112,3, 109,5, 101,5, 65,3, 64,5;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 334,0794 [рассч. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$  333,0719].

JGK017.

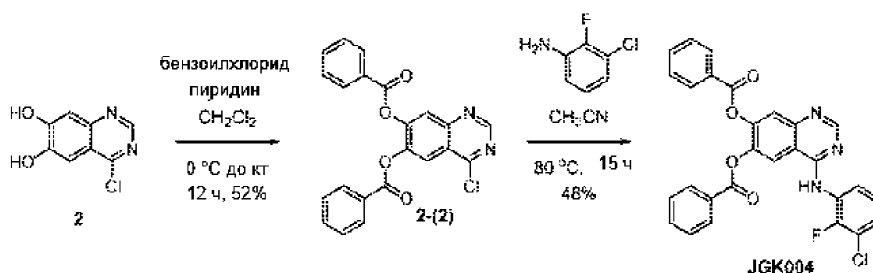


Получение JGK017 проводили согласно общей процедуре; JGK017 (5%).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,59 (с, 1H), 8,15 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,49 (т,  $J=8,1$  Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,34 (д,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,21 (с, 1H), 4,41-4,42 (м, 2H), 4,38-4,40 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,4, 153,2, 149,7, 146,7, 144,5, 138,4, 133,5, 132,2, 128,2, 125,4, 119,9, 119,7, 114,3, 110,4, 105,7, 64,5, 64,3.

Получение JGK004.



Бензоилирование. К холодному ( $0^\circ\text{C}$ ) раствору диола 2 (205 мг, 1,0428 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5,2 мл, 0,2 М) по каплям последовательно добавляли пиридин (0,5 мл) и бензоилхлорид (0,7 мл) в атмосфере  $\text{Ar}$ . После перемешивания при комнатной температуре в течение 12 ч реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 мл) и разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 50$  мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , 10/1) с получением бензоилхлорхиназолина 2-(2) (220 мг, 52%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,07 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 8,04-8,07 (м, 4H), 7,53-7,58 (м, 2H), 7,34-7,39 (м, 4H).

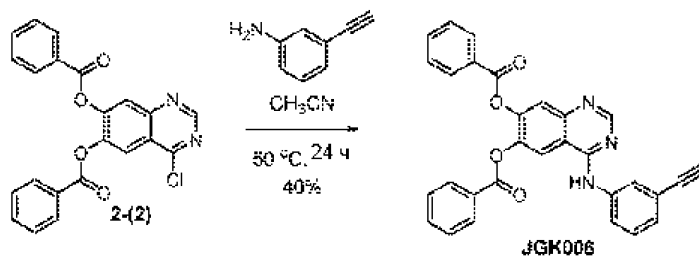
JGK004. В раствор бензоилхлорхиназолина 2-(2) (180 мг, 0,444 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (3,0 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,06 мл, 0,533 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при  $80^\circ\text{C}$  (температура бани) с перемешиванием в течение 15 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , 3/1) с получением JGK004 (109 мг, 48%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,85 (с, 1H), 8,48-8,53 (м, 1H), 8,08 (т,  $J=7,2$  Гц, 4H), 7,99 (д,  $J=3,2$  Гц, 2H), 7,51-7,59 (м, 3H), 7,39 (дд,  $J=8,4, 16,0$  Гц, 4H), 7,16-7,21 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,2, 163,7, 156,6, 155,1, 150,6, 149,1, 148,6, 147,5, 142,1, 134,1, 134,1, 130,3, 130,2, 128,6, 128,6, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 125,3, 124,6, 124,5, 122,9, 121,6, 121,0, 120,9, 114,4, 113,3;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 514,0963 [рассч. для  $\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{O}_4$  513,0886].

Получение JGK006.



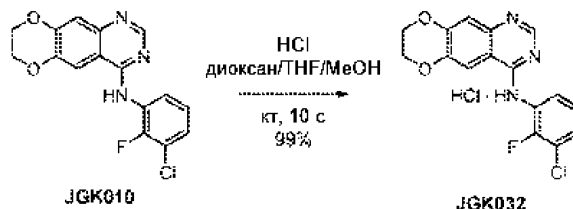
В раствор бензоилхлорхиназолина 2-(2) (100 мг, 0,247 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (3,0 мл) по каплям добавляли 3-этиниланилин (0,05 мл, 0,430 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при  $50^\circ\text{C}$  (температура бани) с перемешиванием в течение 24 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $\text{EtOAc}$ , 4/1) с получением JGK006 (48 мг, 40%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,71 (с, 1H), 8,03 (д,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,96 (с, 1H), 7,90-7,95 (м, 2H), 7,79 (с, 1H), 7,62-7,75 (м, 3H), 7,55 (т,  $J=7,3$  Гц, 1H), 7,48 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,37 (т,  $J=7,4$  Гц, 2H), 7,22-7,31 (м, 4H), 3,04 (с, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,8, 163,9, 156,7, 155,3, 148,9, 146,9, 141,3, 138,1, 134,1, 134,0, 130,3, 130,1, 128,9, 128,6, 128,5, 128,1, 128,0, 127,9, 124,8, 122,7, 122,4, 122,1, 115,1, 113,1, 83,3;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 486,1443 [рассч. для  $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  485,1370]

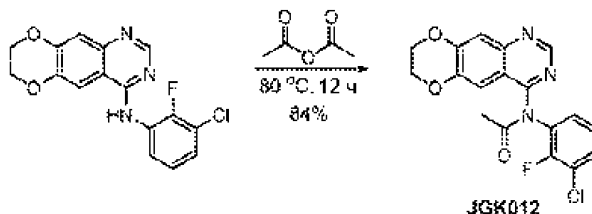
Получение JGK032.



1,0 М раствор хлороводорода получали путем добавления раствора хлороводорода (0,1 мл, 4,0 М в диоксане, 0,4 ммоль) в ТГФ (0,3 мл) при комнатной температуре. В раствор JGK010 (6,1 мг, 0,01839 ммоль) в MeOH по каплям добавляли образованный выше раствор хлороводорода (0,030 мл, 0,030 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 10 с реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением JGK032 (6,7 мг, 99%).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11,63 (с, 1H), 8,81 (с, 1H), 8,36 (с, 1H), 7,63 (ддд,  $J=1,6, 6,9, 8,3$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (ддд,  $J=1,1, 8,1, 16,2$  Гц, 1H), 4,49-4,51 (м, 2H), 4,43-4,45 (м, 2H).

Получение JGK012.



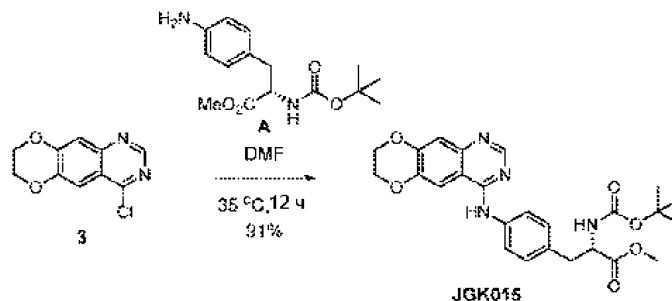
К твердому JGK010 (39 мг, 0,1176 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл). После нагревания при  $80^\circ\text{C}$  (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (20 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc ( $2 \times 30$  мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 2/1 до 1/1) с получением JGK012 (37 мг, выделенный выход 84%).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,01 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,31-7,41 (м, 2H), 7,09 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,41-4,43 (м, 2H), 4,37-4,40 (м, 2H), 2,15 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,2, 159,2, 153,3, 151,3, 149,7, 145,8, 130,6, 129,8, 129,7, 124,7, 122,5, 122,4, 117,7, 113,6, 109,2, 64,5, 64,2, 22,9;

МСВР-ИЭР  $[\text{M}+\text{H}]^+$  обнаружено 374,0701 [рассч. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClFN}_3\text{O}_3$  373,0623].

Получение JGK015.



В раствор аналога L-аминокислоты А (227 мг, 0,7712 ммоль) в DMF (3,0 мл) добавляли одной порцией слитый хлорхиназолин 3 (117 мг, 0,5932 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания при  $35^\circ\text{C}$  (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли насыщенным солевым раствором (30,0 мл) и EtOAc (30,0 мл) с получением желтой суспензии. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc ( $2 \times 50$  мл). Объединенные органические слои концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , от 40/1 до 10/1) с получением JGK015 (261 мг, 92%).

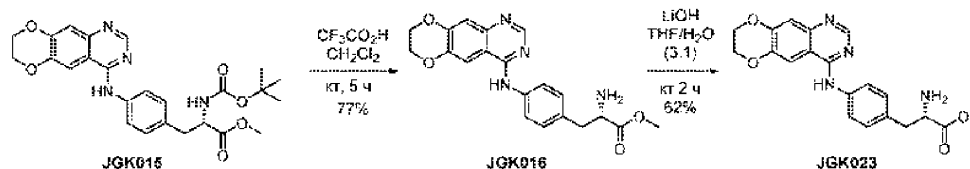
$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,57 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,61 (д,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,37 (с, 1H), 7,27 (с, 1H),

7,08 (д, J=8,5 Гц, 2H), 5,09 (д, J=7,5 Гц, 1H), 4,54 (дд, J=6,0, 13,5 Гц, 1H), 4,31-4,33 (м, 2H), 4,27-4,29 (м, 2H), 3,68 (с, 3H), 3,06 (дд, J=5,6, 14,0 Гц, 1H), 3,00 (дд, J=6,1, 13,8 Гц, 1H), 1,39 (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3;

МСВР-ИЭР [M+H]<sup>+</sup> обнаружено 481,2082 [рассч. для C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 480,2003].

Получение JGK016, JGK023.



JGK016 (снятие защиты Boc). В раствор JGK015 (121 мг, 0,251 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл, 0,05 М) по каплям добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл) при комнатной температуре. После перемешивания при такой же температуре в течение 5 ч реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (20 мл) и разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H<sub>2</sub>O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 20/1) с получением JGK016 (74 мг, 77%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,5 (с, 1H), 8,68 (с, 1H), 8,43 (с, 2H), 8,20 (с, 1H), 7,68 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,26 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,23 (с, 1H), 4,44-4,46 (м, 2H), 4,39-4,41 (м, 2H), 3,68 (с, 3H), 3,03-3,13 (м, 2H);

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,26 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,60 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,17 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,08 (с, 1H), 4,31-4,35 (м, 4H), 3,72 (т, J=6,6 Гц, 1H), 3,68 (с, 3H), 3,27-3,29 (м, 1H), 3,01 (дд, J=5,9, 13,6 Гц, 1H), 2,89 (дд, J=7,0, 13,5 Гц, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, CD<sub>3</sub>OD) δ 174,4, 157,4, 152,6, 149,7, 145,0, 144,2, 137,5, 132,8, 129,2, 122,8, 122,3, 111,5, 110,1, 107,9, 64,5, 64,1, 55,2, 51,0, 39,5;

МСВР-ИЭР [M+H]<sup>+</sup> обнаружено 381,1553 [рассч. для C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 380,1479].

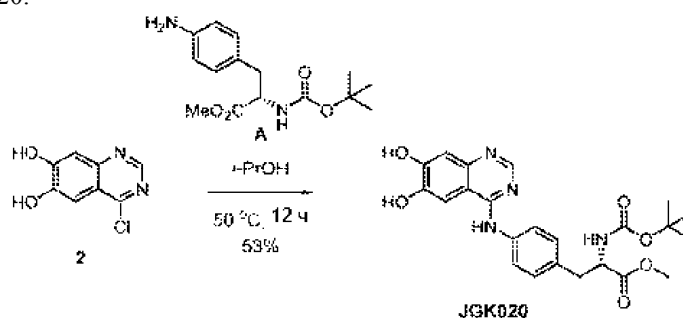
JGK023 (гидролиз). В холодный (0°C) раствор JGK016 (42 мг, 0,1104 ммоль) в ТГФ/Н<sub>2</sub>O (3:1, всего 4,0 мл) добавляли одной порцией гидроксид лития (14 мг). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч реакционную смесь нейтрализовали с помощью 1 н. HCl и разбавляли с помощью EtOAc (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (100 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H<sub>2</sub>O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, от 30/1 до 15/1) с получением JGK023 (25 мг, 62%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,62 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 7,71 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,40 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,24 (с, 1H), 4,48-4,50 (м, 2H), 4,42-4,44 (м, 2H), 4,28 (т, J=6,8 Гц, 1H), 3,32-3,37 (м, 1H), 3,20 (дд, J=7,6, 14,8 Гц, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4;

МСВР-ИЭР [M+H]<sup>+</sup> обнаружено 367,1334 [рассч. для C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 366,1322].

Получение JGK020.



В раствор хлорхиназолина 2 (104 мг, 0,5294 ммоль) в изопропиловом спирте (5,3 мл) по каплям добавляли аминокислоту (187 мг) при комнатной температуре. После нагревания при 50°C (температура бани) с перемешиванием в течение 12 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 5/1 до 3/1) с получением JGK020 (128 мг, 53%).

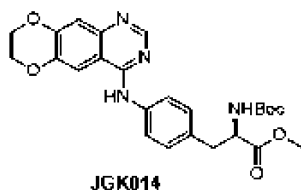
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,68 (с, 1H), 10,22 (шир., 1H), 8,64 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,53 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,26-7,31 (м, 4H), 4,12-4,18 (м, 1H), 3,59 (с, 3H), 2,98 (дд, J=5,2, 14,0 Гц, 1H), 2,84 (дд, J=10,0, 13,2 Гц, 1H), 1,30 (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173,0, 158,2, 155,9, 155,6, 148,7, 148,4, 136,1, 135,8, 129,7, 124,7,

107,6, 107,3, 103,3, 78,8, 55,7, 52,3, 36,3, 28,6;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 455,1920 [рассч. для  $C_{23}H_{26}N_4O_6$  454,1846].

JGK014.



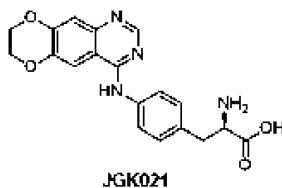
JGK014 (26%).

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,62 (с, 1H), 7,66 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 7,35 (с, 1H), 7,16 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 4,99 (д,  $J=7,6$  Гц, 1H), 4,56-4,62 (м, 1H), 4,36-4,42 (м, 4H), 3,73 (с, 3H), 3,03-3,15 (м, 2H), 1,43 (с, 9H);

$^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 481,2080 [рассч. для  $C_{25}H_{28}N_4O_6$  480,2003].

JGK021.



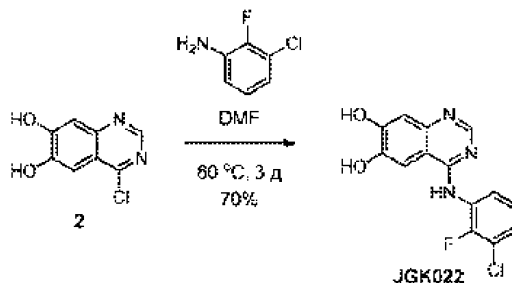
Получение JGK021 проводили согласно процедуре синтеза JGK023.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,62 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 7,71 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 7,40 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 7,24 (с, 1H), 4,48-4,50 (м, 2H), 4,42-4,44 (м, 2H), 4,28 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 3,32-3,37 (м, 1H), 3,20 (дд,  $J=7,6$ , 14,8 Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 367,1347 [рассч. для  $C_{19}H_{18}N_4O_4$  366,1322].

Получение JGK022.



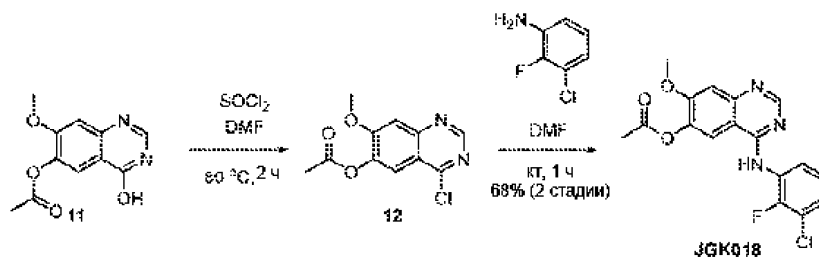
В раствор диола X (121 мг, 0,6155 ммоль) в DMF (3,0 мл) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,14 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 60°C (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли с помощью  $Et_2O$  (30,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью  $Et_2O$  (3×50 мл) и  $CH_2Cl_2$  (2×30 мл) и собирали с получением JGK022 (132 мг, 70%).

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  11,16 (шир., 1H), 10,43 (шир., 1H), 8,68 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,58 (т,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,48 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,30 (т,  $J=8,1$  Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  159,1, 156,4, 154,1, 152,1, 149,1, 148,3, 135,1, 129,7, 128,1, 126,8, 125,7, 120,8, 107,4, 106,9, 102,9;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 306,0437 [рассч. для  $C_{14}H_9ClFN_3O_2$  305,0361].

Получение JGK018.

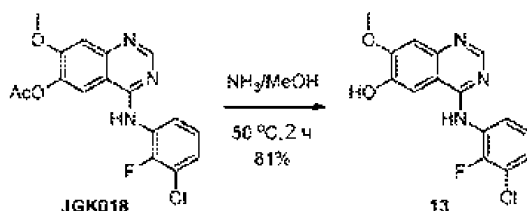


Хлорирование. В раствор 11 (500 мг, 2,134 ммоль) в тионилхлориде (7,5 мл, 0,28 М) по каплям до-

бавляли диметилформамид (0,15 мл). После нагревания при 80°C (температура бани) с перемешиванием в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток последовательно промывали с помощью Et<sub>2</sub>O (200 мл) и немедленно использовали на следующей стадии.

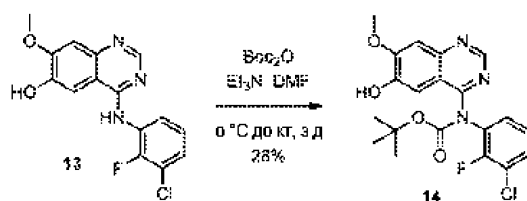
Замещение. В раствор образованного выше хлорхиназолина 12 в безводном DMF (11 мл, 0,2 М) по каплям добавляли 3-хлор-2-фторанилин (0,50 мл, 4,548 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После перемешивания при такой же температуре в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли с помощью Et<sub>2</sub>O (100,0 мл) с получением белой суспензии. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et<sub>2</sub>O (2×50 мл) и собирали с получением JGK018 (525 мг, 68%). Спектроскопические данные совпадали с таковыми Zhang, X. et al., J. Med. Chem., 2015, 55, 8200-8215.

Получение 13.



Снятие защиты с ацетила. В JGK018 (550 мг, 1,520 ммоль) по каплям добавляли раствор аммиака (8,0 мл, 7н. в метаноле). После нагревания при 50°C (температура бани) в герметичной пробирке с перемешиванием в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Полученное белое твердое вещество последовательно промывали с помощью Et<sub>2</sub>O (2×50 мл) и собирали с получением 13 (394 мг, 81%). Полученные спектроскопические данные совпадали с таковыми Zhang, X. et al., J. Med. Chem., 2015, 55, 8200-8215.

Получение 14.

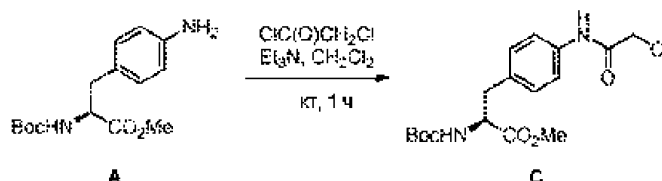


В холодный (0°C) раствор 13 (113 мг, 0,353 ммоль) в безводном DMF (2 мл) по каплям добавляли триэтиламин (0,25 мл, 1,767 ммоль) с последующим добавлением по каплям ди-трет-бутилдикарбоната (62 мг, 0,459 ммоль) в безводном DMF (2 мл) в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 дней реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором H<sub>2</sub>O (10 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2×50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H<sub>2</sub>O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 5/1 до 3/1) с получением 14 (42 мг, выделенный выход 28%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (с, 1H), 8,39-8,45 (м, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,11-7,16 (м, 2H), 3,90 (с, 3H), 1,59 (с, 9H);

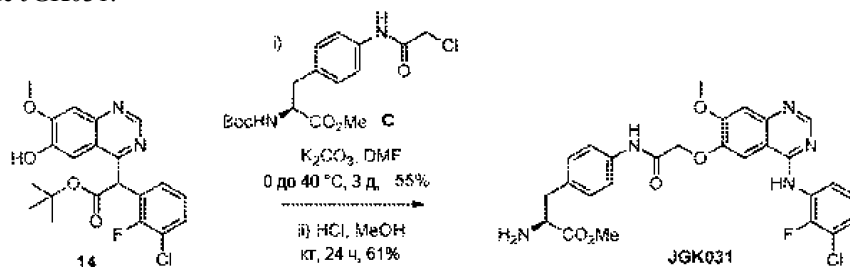
<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,2 (J=39,5 Гц), 154,9, 151,3, 150,3, 149,5 (J=224,1 Гц), 140,4, 128,1 (J=9,6 Гц), 124,8, 124,4 (J=4,8 Гц), 121,5, 120,8 (J=51,2 Гц), 113,5, 109,0, 108,8, 84,6, 56,2, 27,6.

Получение С.



В раствор А<sup>1</sup> (56 мг, 0,1904 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 мл) по каплям добавляли триэтиламин (0,08 мл, 0,5712 ммоль) с последующим добавлением хлорацетилхлорида (0,05 мл, 0,6286 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере Ar. После перемешивания при такой же температуре в течение 1 ч реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (20 мл) и разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×30 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H<sub>2</sub>O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Получение JGK031.



Алкилирование. В холодный (0°C) раствор 14 (44 мг, 0,1058 ммоль) в DMF (2,0 мл) добавляли одной порцией карбонат калия (73 мг, 0,528 ммоль) с последующим добавлением по каплям образованного выше С (0,1904 ммоль) в DMF (2,0 мл) при комнатной температуре. После нагревания при 40°C (температура бани) с перемешиванием в течение 3 дней реакционную смесь гасили с помощью H<sub>2</sub>O (10 мл) и разбавляли с помощью EtOAc (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2×50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали с помощью H<sub>2</sub>O и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/EtOAc, от 100/1 до 30/1) с получением алкилированного продукта 14-(2) (43 мг, выделенный выход 55%).

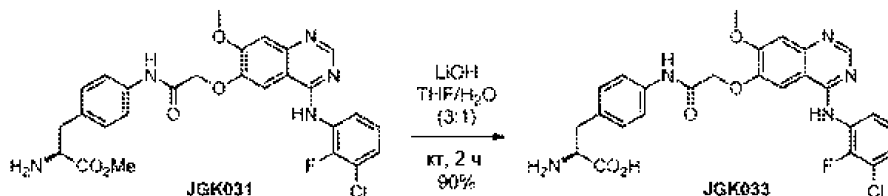
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,16 (с, 1H), 7,48 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,44 (с, 1H), 6,98-7,13 (м, 5H), 6,34 (м, 1H), 4,95 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,54 (д, J=6,5 Гц, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,69 (с, 6H), 2,95-3,13 (м, 2H), 1,53 (с, 9H), 1,40 (с, 9H).

Снятие защиты. В раствор алкилированного продукта 14-(2) (26 мг, 0,0348 ммоль) в безводном MeOH (5,0 мл) по каплям добавляли 0,5н. раствор хлороводорода (0,5 мл). После перемешивания при такой же температуре в течение 24 ч реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель с обращенной фазой, MeOH или MeOH/H<sub>2</sub>O, 10/1) с получением JGK031 (12 мг, 61%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,20 (с, 1H), 7,67 (с, 1H), 7,49 (т, J=7,9 Гц, 2H), 7,24-7,30 (м, 1H), 7,11-7,21 (м, 4H), 3,94 (с, 3H), 3,59 (с, 3H), 2,83-3,01 (м, 2H);

МСВР-ИЭР [M+H]<sup>+</sup> обнаружено 554,1631 [рассч. для C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 553,1522].

## Получение JGK033.



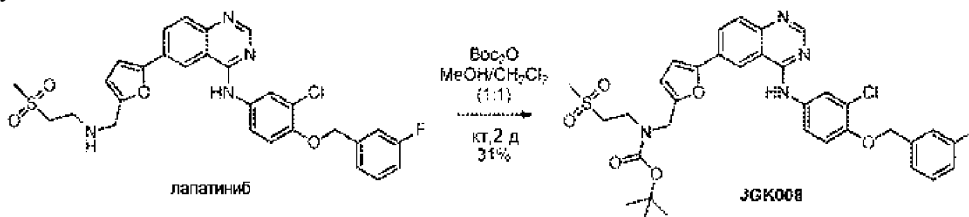
В раствор JGK031 (5 мг, 0,009026 ммоль) в безводном ТГФ (6 мл) и H<sub>2</sub>O (2 мл) добавляли гидроксид лития·H<sub>2</sub>O (3 мг) одной порцией. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч реакционную смесь нейтрализовали 1 н. раствором хлороводорода и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной обращенно-фазовой хроматографии (обращенно-фазовый силикагель, MeOH/H<sub>2</sub>O, 5/1) с получением JGK033 (4,4 мг, 90%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,16 (с, 1H), 6,32 (с, 1H), 6,03 (д, J=8,2 Гц, 2H), 5,89-5,98 (м, 2H), 5,59-5,79 (м, 4H), 4,00 (с, 2H), 2,51 (с, 3H), 2,46 (т, J=5,6 Гц, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 163,9, 159,4, 157,2, 154,3, 152,1, 149,5, 137,1, 135,4, 129,7, 126,9, 124,6, 121,5, 120,3, 108,0, 106,9, 97,8, 56,6, 53,5, 35,6;

МСВР-ИЭР [M+H]<sup>+</sup> обнаружено 540,1435 [рассч. для C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 539,1366].

## Получение JGK008.



В раствор лапатиниба (326 мг, 0,561 ммоль) в безводном MeOH (5,6 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,6 мл) по каплям добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (378 мг, 2,819 ммоль) одной порцией в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 дней реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором H<sub>2</sub>O (10 мл) и разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5×50 мл). Объединенные органические слои последовательно про-



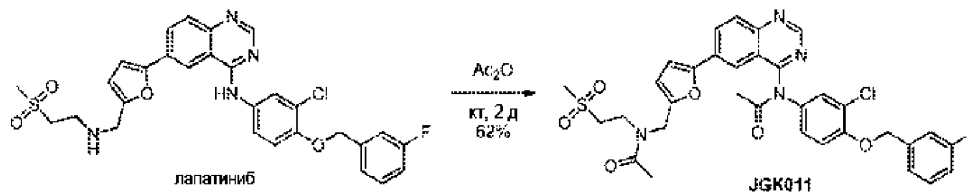
мывали с помощью  $H_2O$  и насыщенного солевого раствора, сушили над безводным  $MgSO_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $EtOAc$ , от 3/1 до 1/1) с получением JGK008 (119 мг, выделенный выход 31%).

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,71 (bs, 1H), 8,64 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 7,85-7,95 (м, 3H), 7,68 (д,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,32-7,37 (м, 1H), 7,21 (дд,  $J=8,4, 10,8$  Гц, 2H), 6,98-7,03 (м, 1H), 6,96 (д,  $J=8,9$  Гц, 1H), 6,39 (д,  $J=47,1$  Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 4,53 (д,  $J=32,2$  Гц, 2H), 3,99 (т,  $J=7,3$  Гц, 2H), 3,39 (д,  $J=66,1$  Гц, 2H), 2,89 (с, 3H), 1,49 (с, 9H);

$^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163,9, 162,0, 158,0, 154,2, 152,7, 151,7, 151,0, 139,1 (д,  $J=7,3$  Гц), 132,4, 130,1 (д,  $J=8,1$  Гц), 129,1, 128,6, 128,2, 125,1, 123,1, 122,4, 122,3, 115,4, 114,9 (д,  $J=21,0$  Гц), 114,1 (д,  $J=13,9$  Гц), 113,9, 111,5, 110,9, 107,7, 81,3, 70,9, 45,0, 43,6, 42,3, 41,4, 41,2, 28,4;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 681,1946 [рассч. для  $C_{34}H_{34}ClFN_4O_6S$  680,1866].

Получение JGK011.



К твердому лапатинибу (68 мг, 0,353 ммоль) добавляли ангидрид уксусной кислоты (5,0 мл) в атмосфере  $Ar$ . После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 дней реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (силикагель, гексаны/ $EtOAc$ , от 3/1 до 1/3) с получением JGK002 (48 мг, выделенный выход 62%).

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,18 (с, 1H), 8,10-8,17 (м, 3H), 7,50 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 7,27-7,36 (м, 2H), 7,18 (дд,  $J=7,6, 13,8$  Гц, 2H), 6,97-7,03 (м, 2H), 6,79 (д,  $J=3,3$  Гц, 1H), 6,44 (д,  $J=3,3$  Гц, 1H), 5,14 (с, 2H), 4,66 (с, 2H), 3,86 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H), 3,30 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H), 2,95 (с, 3H), 2,33 (с, 3H), 2,23 (с, 3H);

$^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171,4, 171,2, 163,9, 162,2, 162,0, 154,0, 153,7, 152,5, 151,0, 138,5 ( $J=7,3$  Гц), 134,2, 130,8, 130,3, 130,2, 129,9, 129,1, 127,4, 123,9, 122,4 ( $J=2,9$  Гц), 121,8, 118,0, 115,1, 115,0, 114,0 ( $J=5,2$  Гц), 113,8, 111,1, 108,9, 70,1 ( $J=1,7$  Гц), 52,3, 47,0, 41,4, 40,7, 23,7, 21,8;

МСВР-ИЭР  $[M+H]^+$  обнаружено 665,1628 [рассч. для  $C_{33}H_{30}ClFN_4O_6S$  664,1553].

Пример 2. Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK.

Общая химическая информация.

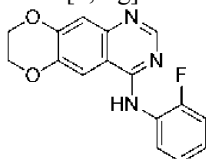
Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора SEM Discover. Реакции при комнатной температуре проводили при температуре окружающей среды (приблизительно  $23^\circ C$ ). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60  $F_{254}$  с пятнами, визуализированными УФ-светом ( $\lambda=254, 365$  нм) или с использованием щелочного раствора  $KMnO_4$ . Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на  $SiO_2$  60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при  $25-50^\circ C$ . Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса ( $^1H$  ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода ( $^{13}C$  ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР ( $\delta$  ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные  $^1H$  ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, quint=квинтет, м=мультиплет/смешанный тип, тд=триплет дублетов, ддд=дублет дублетов дублетов, шир.=широкий сигнал); постоянные взаимодействия ( $J$ ) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР  $^{13}C$  представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART. Соединения 4-хлор-7,8-дигидро[1,4]диоксина[2,3- $g$ ]хиназолина (1), 4-хлорхиназолин-6,7-диола (2) и JGK010 получали, как указано выше.

Общая процедура А для синтеза 4-анилинохиназолиновых соединений JGK035-JGK041 и JGK043.

Смесь 4-хлорхиназолина (1 экв.) в  $iPrOH$  (0,1-0,3 м) обрабатывали с помощью анилина (1 экв.) и смесь нагревали при  $80^\circ C$  в условиях микроволнового излучения (60 Вт) в течение 15-20 мин. Смесь охлаждали до  $23^\circ C$ , обрабатывали дополнительным анилином (1 экв.) и снова подвергали микроволновому излучению ( $80^\circ C$ , 60 Вт, 15-20 мин). Смесь либо концентрировали при пониженном давлении, или осажденную соль 4-анилинохиназолина гидрохлорида выделяли путем фильтрации (промывки холодным  $iPrOH$ ). Остаток

супендировали в насыщ. водн. растворе  $\text{NaHCO}_3$  и экстрагировали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×). Объединенные органические экстракты промывали водой, солевым раствором, сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и концентрировали. Очистка посредством ФХ (элюирование градиентом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  или гексаны/ $\text{EtOAc}$ ) обеспечивала получение необходимых продуктов, обычно в виде от белого до грязно-белого или бледно-желтого твердых веществ.

N-(2-Фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK035).



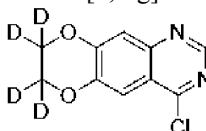
После общей процедуры А соединение JGK035 получали из 4-хлорхиназолина 1 (51 мг, 0,23 ммоль) и 2-фторанилина (40 мкл, 0,48 ммоль) в  $i\text{PrOH}$  (1,5 мл). ФХ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  10:1→10:4) обеспечивала получение JGK035 (56 мг, 82%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,64 (тд,  $J=8,2, 1,7$  Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,31 (с, 1H), 7,22 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,17 (ддд,  $J=11,2, 8,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,10-7,05 (м, 1H), 4,44-4,37 ppm (м, 4H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,08, 153,60, 153,50 (д,  $J=242,7$  Гц), 149,52, 146,65, 144,34, 127,31 (д,  $J=9,5$  Гц), 124,66 (д,  $J=3,7$  Гц), 123,97 (д,  $J=7,8$  Гц), 122,89, 115,06 (д,  $J=19,3$  Гц), 114,46, 110,62, 106,10, 64,69, 64,51 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{O}_2^-$ , 296,0841; обнаружено 296,0841.

4-Хлор(7,7,8,8- $^2\text{H}_4$ )-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (3).



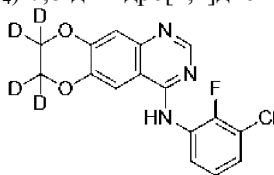
Раствор соединения 2 (193 мг, 0,98 ммоль) в сухом DMF (4,8 мл) обрабатывали с помощью  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (788 мг, 2,42 ммоль), перемешивали в течение 5 мин и по каплям обрабатывали с помощью 1-бром-2-хлор( $^2\text{H}_4$ )этана (270 мкл, 3,16 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч и затем при 70°C в течение 18 ч. После охлаждения смеси до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 мл), промывали водой (2×13 мл), солевым раствором (13 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  1:0→10:1,5) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 3 (109 мг, 49%) в виде белого рыхлого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,84 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,47 ppm (с, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160,19, 152,52, 151,54, 147,93, 146,06, 120,10, 113,72, 110,83 ppm (два углерода, направленных в область сильного поля, не наблюдаются);

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{D}_4\text{ClN}_2\text{O}_2^+$ , 227,0520; обнаружено 227,0516.

N-(3-Хлор-2-фторфенил)(7,7,8,8- $^2\text{H}_4$ )-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK036).



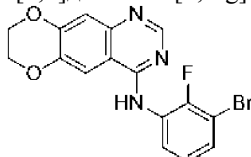
После общей процедуры А соединение JGK036 получали из 4-хлорхиназолина 3 (55 мг, 0,24 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (52 мкл, 0,47 ммоль) в  $i\text{PrOH}$  (1,2 мл). JGK036·HCl выделяли фильтрацией из неочищенной реакционной смеси, и после подщелачивания и экстракции получали чистый JGK036 (67 мг, 82%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,53-7,43 (м, 2H), 7,27 (тд,  $J=8,1, 1,3$  Гц, 1H), 7,19 ppm (с, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  157,17, 153,10, 152,45 (д,  $J=249,2$  Гц), 149,28, 146,04, 143,68, 128,21 (д,  $J=12,0$  Гц), 127,27, 127,03, 124,87 (д,  $J=4,7$  Гц), 120,11 (д,  $J=16,7$  Гц), 112,48, 109,64, 108,35, 63,50 (м, 2C');

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{D}_4\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$ , 336,0848; обнаружено 336,0841.

N-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK037).



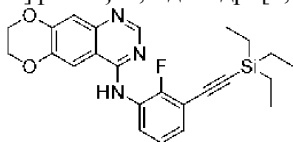
После общей процедуры А соединение JGK037 получали из 4-хлорхиназолина 1 (100 мг, 0,45 ммоль)

и 3-бром-2-фторанилина (100 мкл, 0,89 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 10:0→10:3) обеспечивала получение JGK037 (150 мг, 89%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,3, 7,4, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (шир., 1H), 7,29 (с, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,44-4,38 ppm (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,89, 153,37, 150,15 (д, J=242,2 Гц), 149,70, 146,75, 144,53, 128,65 (д, J=10,5 Гц), 127,24, 125,31 (д, J=4,7 Гц), 121,79, 114,53, 110,59, 108,59 (д, J=19,4 Гц), 105,93, 64,70, 64,51 ppm; МСВР (DART): m/z [M-H]<sup>-</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 373,9946; обнаружено 373,9946.

N-{2-Фтор-3-[(триэтилсилил)этинил]фенил}-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (4).



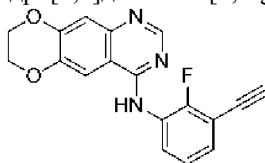
Во флакон объемом 1 драм загружали JGK010 (75 мг, 0,23 ммоль), XPhos (19,7 мг, 0,041 ммоль), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (195 мг, 0,60 ммоль), [PdCl<sub>2</sub>·(MeCN)<sub>2</sub>] (3,6 мг, 0,014 ммоль). Сосуд вакуумировали и снова заполняли аргоном (повторяется по меньшей мере два раза). Сухой ацетонитрил (1 мл) добавляли и оранжевую суспензию перемешивали при 23°C в течение 25 мин, затем вводили этинилтриэтилсилан (150 мкл, 0,84 ммоль). Пробирку герметизировали и реакционную смесь перемешивали при 95°C в предварительно нагретой масляной бане в течение 3,5 ч. Суспензии позволяли достичь 23°C, разбавляли с помощью EtOAc, фильтровали через слой SiO<sub>2</sub> (промывки с помощью EtOAc) и выпаривали. Очистка посредством ФХ (SiO<sub>2</sub>; гексаны/EtOAc 8:2→4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 4 (48 мг, 49%) в виде желтого пенистого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,681 (тд, J=8,1, 1,9 Гц, 1H), 8,678 (с, 1H), 7,382 (с, 1H), 7,376 (шир., 1H), 7,28 (с, 1H), 7,21-7,12 (м, 2H), 4,44-4,38 (м, 4H), 1,07 (т, J=7,9 Гц, 9H), 0,71 ppm (к, J=7,9 Гц, 6H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,95, 153,81 (д, J=248,0 Гц), 153,44, 149,62, 146,66, 144,47, 127,68, 127,60, 124,15 (д, J=4,5 Гц), 122,79, 114,49, 111,77 (д, J=14,6 Гц), 110,61, 105,97, 98,65, 98,49 (д, J=3,7 Гц), 64,70, 64,51, 7,63, 4,50 ppm;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Si<sup>+</sup>, 436,1851; обнаружено 436,1831.

N-(3-Этинил-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK038).



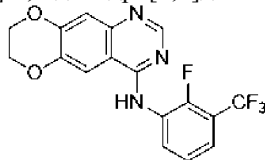
Смесь соединения 4 (40 мг, 0,09 ммоль) в мокром ТГФ (0,9 мл) по каплям обрабатывали с помощью 1 М раствора TBAF в ТГФ (450 мкл, 0,45 ммоль) и смесь перемешивали при 23°C в течение 18 ч. Воду (10 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл). Объединенные органические вещества промывали солевым раствором (20 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (SiO<sub>2</sub>; гексаны/EtOAc 7:3→3:7) с последующей второй ФХ (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:0→6:4) обеспечивала получение JGK038 (19 мг, 64%) в виде грязно-белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (тд, J=8,0, 1,8 Гц, 1H), 8,67 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,29 (с, 1H), 7,24-7,15 (м, 2H), 4,43-4,38 (м, 4H), 3,34 ppm (с, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,94, 154,04 (д, J=248,8 Гц), 153,39, 149,65, 146,70, 144,47, 127,81, 127,68 (д, J=9,1 Гц), 124,30 (д, J=4,7 Гц), 123,47, 114,49, 110,58, 110,50 (д, J=14,3 Гц), 105,99, 82,95 (д, J=3,5 Гц), 76,70 (д, J=1,6 Гц), 64,69, 64,50 ppm;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 322,0986; обнаружено 322,0981.

N-[2-Фтор-3-(трифторметил)фенил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK039).



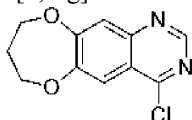
После общей процедуры А соединение JGK039 получали из 4-хлорхиназолина 1 (37 мг, 0,17 ммоль) и 2-фтор-3-(трифторметил)анилина (42 мкл, 0,33 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:0→10:3) обеспечивала получение JGK039 (35 мг, 58%) в виде грязно-белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,00-8,92 (м, 1H), 8,70 (с, 1H), 7,42 (шир., 1H), 7,40 (с, 1H), 7,35-7,28 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 4,46-4,38 ppm (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,77, 153,24, 150,27 (д, J=252,0 Гц), 149,81, 146,80, 144,66, 128,62 (д, J=8,5 Гц), 126,34, 124,44, 124,40, 122,66 (к, J=272,4 Гц), 120,41 (к, J=4,6 Гц), 114,58, 110,55, 105,86, 64,70, 64,51 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M-H]^-$  расщ. для  $C_{17}H_{10}F_4N_3O_2^-$ , 364,0715; обнаружено 364,0712.

4-Хлор-8,9-дигидро-7Н-[1,4]диоксепино[2,3-*g*]хиназолин (5).



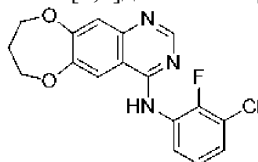
Раствор соединения 2 (100 мг, 0,51 ммоль) в сухом DMF (10 мл) обрабатывали с помощью  $Cs_2CO_3$  (460 мг, 1,41 ммоль), перемешивали в течение 15 мин и по каплям обрабатывали с помощью 1,3-дибромпропана (135 мкл, 1,33 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч и затем при 65°C в течение 18 ч. После охлаждения до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток суспендировали в  $CH_2Cl_2$  (20 мл) и промывали водой (2×5 мл), высушивали ( $Na_2SO_4$ ), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (гексаны/ $CH_2Cl_2$  1:10→0:1→ $CH_2Cl_2$ /EtOAc 10:1,5) с последующей другой ФХ (гексаны/EtOAc 10:1→10:3) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 5 (41 мг, 34%) в виде белого твердого вещества.

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,87 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,55 (с, 1H), 4,46 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H), 4,40 (т,  $J=6,0$  Гц, 2H), 2,34 ppm (quint,  $J=5,9$  Гц, 2H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  160,57, 158,86, 153,10, 153,03, 148,88, 120,83, 118,19, 115,64, 70,51, 70,33, 30,51 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{16}H_{10}ClN_2O_2^+$ , 237,0425; обнаружено 237,0416.

N-(3-Хлор-2-фторфенил)-8,9-дигидро-7Н-[1,4]диоксепино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK040).



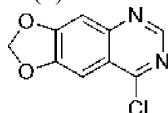
После общей процедуры А соединение JGK040 получали из 4-хлорхиназолина 5 (33 мг, 0,14 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (32 мкл, 0,29 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ ( $CH_2Cl_2$ /EtOAc 1:0→10:3,5) обеспечивала получение JGK040 (34 мг, 70%) в виде белого твердого вещества.

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  9,72 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,53-7,45 (м, 2H), 7,29 (с, 1H), 7,27 (тд,  $J=8,1$ , 1,3 Гц, 1H), 4,32 (т,  $J=5,5$  Гц, 2H), 4,29 (т,  $J=5,6$  Гц, 2H), 2,22 ppm (quint,  $J=5,6$  Гц, 2H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  157,43, 156,67, 153,85, 152,48 (д,  $J=249,3$  Гц), 150,74, 147,29, 128,05 (д,  $J=12,0$  Гц), 127,41, 127,04, 124,91 (д,  $J=4,7$  Гц), 120,13 (д,  $J=16,5$  Гц), 117,52, 113,81, 110,77, 70,75, 70,62, 30,80 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{17}H_{14}ClFN_3O_2^+$ , 346,0753; обнаружено 346,0740.

8-Хлор-2Н-[1,3]диоксо[4,5-*g*]хиназолин (6).



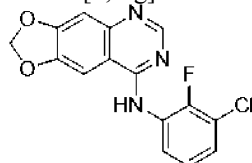
Раствор соединения 2 (100 мг, 0,51 ммоль) в сухом DMF (3,4 мл) обрабатывали с помощью  $Cs_2CO_3$  (335 мг, 1,03 ммоль) и перемешивали при 23°C в течение 15 мин. Смесь по каплям обрабатывали с помощью хлоридметана (130 мкл, 1,79 ммоль), перемешивали в течение 1 ч и затем при 70°C в течение 17 ч. После охлаждения смеси до 23°C все летучие вещества удаляли в вакууме. Остаток суспендировали в  $CH_2Cl_2$  (30 мл), промывали водой (2×7 мл), сушили ( $Na_2SO_4$ ), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ (гексаны/ $CH_2Cl_2$  3:10→0:1→ $CH_2Cl_2$ /EtOAc 10:2) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 6 (38 мг, 36%) в виде белого рыхлого твердого вещества.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,85 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,32 (с, 1H), 6,21 ppm (с, 2H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  159,82, 154,89, 152,79, 150,94, 149,78, 121,23, 105,23, 102,89, 101,12 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_9H_6ClN_2O_2^+$ , 209,0112; обнаружено 209,0104.

N-(3-Хлор-2-фторфенил)-2Н-[1,3]диоксо[4,5-*g*]хиназолин-8-амин (JGK041).



После общей процедуры А соединение JGK041 получали из 4-хлорхиназолина 6 (35 мг, 0,17 ммоль) и 3-хлор-2-фторанилина (38 мкл, 0,35 ммоль) в *i*PrOH (1,5 мл). ФХ ( $CH_2Cl_2$ /EtOAc 1:0→1:1) обеспечивала получение JGK041 (35 мг, 66%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

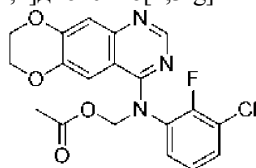
$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  9,53 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,53-7,44 (м, 2H), 7,27 (тд,

$J=8,1, 1,3$  Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 6,25 ppm (с, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  157,37, 153,10, 152,60, 152,43 (д,  $J=248,9$  Гц), 148,56, 147,28, 128,30 (д,  $J=11,9$  Гц), 127,17, 126,90, 124,88 (д,  $J=4,8$  Гц), 120,12 (д,  $J=16,4$  Гц), 109,82, 104,59, 102,38, 98,77 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$ , 318,0440; обнаружено 318,0435.

[(3-Хлор-2-фторфенил)(7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-ил)амино]метилацетат (JGK043).



Смесь JGK010 (50 мг, 0,15 ммоль) в сухом ТГФ (0,5 мл) по каплям обрабатывали с помощью 1 М раствора  $\text{LiHMDS}$  в ТГФ (150 мкл, 0,15 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$ . После перемешивания в течение 15 мин при этой температуре смесь добавляли по каплям в раствор хлорметилацетата (55 мкл, 0,57 ммоль) в сухом ТГФ (0,5 мл). Колбу, которая изначально содержала раствор JGK010, промывали с помощью 0,5 мл сухого ТГФ и добавляли в реакционную смесь. После перемешивания при  $0^\circ\text{C}$  в течение 2 ч перемешивание продолжали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 22 ч. Насыщ. водн. раствор  $\text{NaHCO}_3$  (10 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $3 \times 10$  мл). Объединенные органические вещества сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали в вакууме. Очистка посредством ФХ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  1:0→1:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения JGK043 (30 мг, 49%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,93 (с, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,08-6,97 (м, 2H), 6,94 (тд,  $J=7,2, 2,1$  Гц, 1H), 6,82 (с, 1H), 5,73 (с, 2H), 4,40-4,29 (м, 4H), 2,12 ppm (с, 3H);

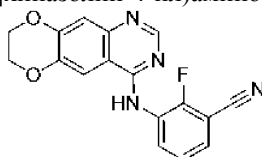
$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,33, 152,96, 150,10 (д,  $J=245,6$  Гц), 149,37, 148,05, 143,24, 140,17 (д,  $J=13,1$  Гц), 131,89, 124,17, 124,12 (д,  $J=4,8$  Гц), 122,59 (д,  $J=2,4$  Гц), 121,33 (д,  $J=17,1$  Гц), 115,41, 114,31, 102,24, 71,19, 65,07, 64,23, 20,85 ppm;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClFN}_3\text{O}_4^+$ , 404,0808; обнаружено 404,0792.

Пример 3. Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK.

Общие процедуры. Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора SEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно  $23^\circ\text{C}$ ). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60  $\text{F}_{254}$  с пятнами, визуализированными УФ-светом ( $\lambda=254, 365$  нм) или с использованием щелочного раствора  $\text{KMnO}_4$ . Колонную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на  $\text{SiO}_2$  60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при  $25-50^\circ\text{C}$ . Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода ( $^{13}\text{C}$  ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР ( $\delta$  ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные  $^1\text{H}$  ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, quint=квинтет, м=мультиплет/смешанный тип, тд=триплет дублетов, ддд=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия ( $J$ ) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействия. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопробоотборником.

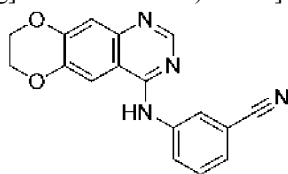
3-[(7,8-Дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-ил)амино]-2-фторбензонитрил (JGK044).



$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,06-8,98 (м, 1H), 8,69 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,35-7,31 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,63, 153,63 (д,  $J=254,6$  Гц), 153,04, 149,94, 146,80, 144,76, 128,60 (д,  $J=7,8$  Гц), 127,48, 126,58, 125,31 (д,  $J=4,5$  Гц), 114,56, 113,80, 110,45, 105,83, 101,30 (д,  $J=13,9$  Гц), 64,70, 64,51 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  рассч. для  $C_{17}H_{12}FN_4O_2^+$ , 323,0939; обнаружено 323,0927.  
3-[(7,8-Дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-ил)амино]бензонитрил (JGK045).

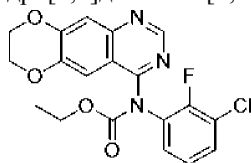


$^1H$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,68 (с, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,46 (т,  $J=1,9$  Гц, 1H), 8,18 (ддд,  $J=8,2, 2,3, 1,2$  Гц, 1H), 8,08 (с, 1H), 7,58 (т,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,53 (дт,  $J=7,6, 1,4$  Гц, 1H), 7,22 (с, 1H), 4,49-4,36 м.д. (м, 4H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,24, 152,69, 149,31, 146,15, 143,80, 140,52, 129,87, 126,35, 125,96, 124,15, 118,93, 112,66, 111,23, 109,96, 108,30, 64,52, 64,19 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  рассч. для  $C_{17}H_{13}N_4O_2^+$ , 305,1033; обнаружено 305,1018.

Этил-(3-хлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-илкарбамат (JGK047).

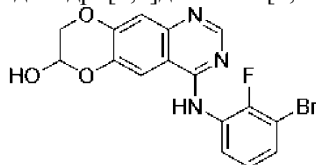


$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,96 (с, 1H), 7,483 (с, 1H), 7,477 (с, 1H), 7,37 (дд,  $J=8,1, 6,7$  Гц, 2H), 7,08 (тд,  $J=8,1, 1,5$  Гц, 1H), 4,45-4,38 (м, 4H), 4,27 (q,  $J=7,1$  Гц, 2H), 1,22 м.д. (т,  $J=7,1$  Гц, 3H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  158,98, 154,43 (д,  $J=250,7$  Гц), 153,90, 153,41, 151,17, 149,68, 145,61, 130,12, 129,85 (д,  $J=12,4$  Гц), 128,20, 124,50 (д,  $J=5,1$  Гц), 122,22 (д,  $J=16,8$  Гц), 117,96, 113,51, 109,68 (д,  $J=2,0$  Гц), 64,73, 64,36, 63,44, 14,43 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  рассч. для  $C_{19}H_{16}ClFN_3O_4^+$ , 404,0808; обнаружено 404,0800.

( $\pm$ )-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ол (( $\pm$ )-JGK050).

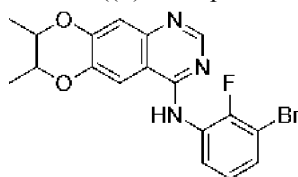


$^1H$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,61 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,72 (д,  $J=5,4$  Гц, 1H), 7,60 (т,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,55 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,21 (т,  $J=8,2$  Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 5,70-5,59 (м, 1H), 4,27 (д,  $J=11,0$  Гц, 1H), 4,17 м.д. (д,  $J=10,6$  Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,18, 153,38 (д,  $J=247,4$  Гц), 153,13, 148,78, 146,14, 141,92, 130,12, 128,05 (д,  $J=13,8$  Гц), 127,78, 125,45 (д,  $J=4,4$  Гц), 111,95, 109,87, 108,71, 108,55 (д,  $J=20,3$  Гц), 88,63, 67,23 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  рассч. для  $C_{16}H_{12}BrFN_3O_3^+$ , 392,0041; обнаружено 392,0030.

Диастереомерная смесь ( $\pm$ )-цис- и ( $\pm$ )-транс-N-(3-бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амина (( $\pm$ )-цис/транс-JGK051).



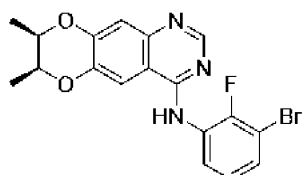
$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ ; ( $\pm$ )-цис/транс 2:1)  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,68-8,63 (м, 1H), 7,37 (с, 1H), 7,35 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 4,52-4,39 (м, 1,3H), 4,09-3,98 (м, 0,7H), 1,453 (д,  $J=6,1$  Гц, 1,1H), 1,451 (д,  $J=6,1$  Гц, 1,1H), 1,369 (д,  $J=6,6$  Гц, 1,9H), 1,368 м.д. (д,  $J=6,6$  Гц, 1,9H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ ; ( $\pm$ )-цис/транс 2:1)  $\delta$  155,87, 155,84, 153,19, 150,12 (д,  $J=242,5$  Гц), 150,09 (д,  $J=242,2$  Гц), 149,87, 148,89, 146,77, 144,64, 143,63, 128,73 (д,  $J=10,0$  Гц), 127,15, 127,12, 125,31 (д,  $J=4,7$  Гц), 121,71, 121,70, 114,30, 113,93, 110,54, 110,47, 108,57 (д,  $J=19,4$  Гц), 105,66, 105,28 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  рассч. для  $C_{18}H_{16}BrFN_3O_2^+$ , 404,0404; обнаружено 404,0393.

( $\pm$ )-цис-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK052).

044668

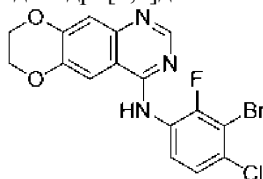


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд,  $J=8,6, 7,4, 1,6$  Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,35 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,30-7,23 (м, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,50-4,41 (м, 2H), 1,369 (д,  $J=6,6$  Гц, 3H), 1,368 м.д. (д,  $J=6,5$  Гц, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,85, 153,19, 150,11 (д,  $J=242,1$  Гц), 148,89, 146,77, 143,63, 128,73 (д,  $J=10,2$  Гц), 127,14, 125,31 (д,  $J=4,7$  Гц), 121,71, 114,30, 110,54, 108,57 (д,  $J=19,5$  Гц), 105,65, 72,85, 72,58, 14,71, 14,55 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$ , 404,0404; обнаружено 404,0416.

N-(3-Бром-4-хлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK053).

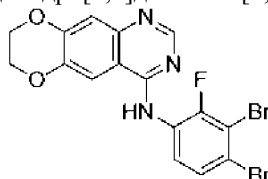


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,70 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,61 (дд,  $J=8,8, 7,7$  Гц, 1H), 7,55 (дд,  $J=8,7, 1,5$  Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 4,47-4,35 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  157,03, 154,14 (д,  $J=249,5$  Гц), 153,01, 149,36, 146,08, 143,74, 130,75, 127,77 (д,  $J=2,9$  Гц), 126,80 (д,  $J=13,4$  Гц), 125,37 (д,  $J=3,8$  Гц), 112,50, 110,15 (д,  $J=22,5$  Гц), 109,66, 108,39, 64,51, 64,14 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$ , 409,9702; обнаружено 409,9697.

N-(3,4-Дибром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK054).

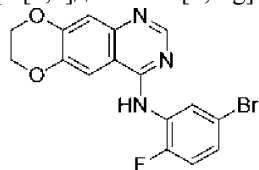


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,65 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,67 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 7,55 (т,  $J=8,2$  Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 4,45-4,35 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  156,95, 153,98 (д,  $J=249,1$  Гц), 152,99, 149,35, 146,09, 143,74, 128,50 (д,  $J=3,7$  Гц), 128,14, 127,21 (д,  $J=13,7$  Гц), 120,96, 112,51, 112,33, 109,68, 108,36, 64,51, 64,14 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{FN}_3\text{O}_2^+$ , 453,9197; обнаружено 453,9191.

N-(5-Бром-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK055).

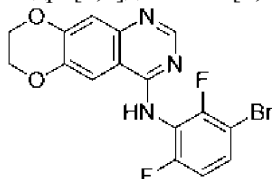


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,99 (дд,  $J=7,3, 2,5$  Гц, 1H), 8,72 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,27 (с, 1H), 7,16 (ддд,  $J=8,7, 4,6, 2,5$  Гц, 1H), 7,04 (дд,  $J=10,9, 8,7$  Гц, 1H), 4,44-4,36 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,59, 153,35, 152,16 (д,  $J=243,1$  Гц), 149,69, 146,67, 144,52, 128,75 (д,  $J=10,5$  Гц), 126,16 (д,  $J=7,6$  Гц), 125,06, 117,19 (д,  $J=3,4$  Гц), 116,20 (д,  $J=20,9$  Гц), 114,52, 110,48, 105,85, 64,68, 64,50 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$ , 376,0091; обнаружено 376,0077.

N-(3-Бром-2,6-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK056).



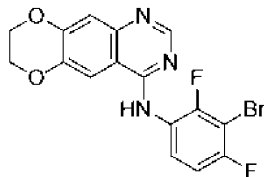
$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,60 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,74 (тд,  $J=8,1, 5,5$  Гц, 1H), 7,28 (т,  $J=9,3$  Гц, 1H), 7,21 (с, 1H), 4,44-4,38 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  157,78 (дд,  $J=248,8, 3,3$  Гц), 157,37, 155,01 (дд,  $J=247,9, 4,9$  Гц),

153,08, 149,47, 146,04, 143,86, 130,76 (д, J=9,3 Гц), 117,30 (т, J=17,5 Гц), 113,30 (дд, J=21,8, 3,0 Гц), 112,56, 109,45, 108,28, 103,55 (дд, J=20,4, 3,6 Гц), 64,52, 64,14 м.д.;

МСВР (ИЭР): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 393,9997; обнаружено 394,0008.

N-(3-Бром-2,4-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK057).

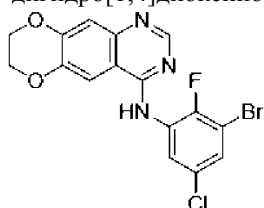


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,64 (с, 1H), 8,51 (тд, J=9,0, 5,6 Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 7,23 (уш, 1H), 7,04 (ддд, J=9,2, 7,8, 2,1 Гц, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,10, 155,80 (дд, J=246,6, 3,5 Гц), 153,28, 151,25 (дд, J=245,1, 4,0 Гц), 149,74, 146,56, 144,53, 124,39 (дд, J=10,8, 3,4 Гц), 122,72 (дд, J=8,3, 1,8 Гц), 114,42, 111,49 (дд, J=22,5, 3,9 Гц), 110,34, 105,98, 97,86 (дд, J=25,7, 22,9 Гц), 64,69, 64,50 м.д.;

МСВР (ИЭР): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 393,9997; обнаружено 394,0013.

N-(3-Бром-5-хлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK058).

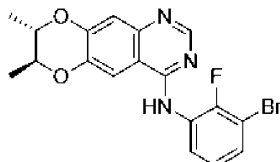


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,88 (дд, J=6,6, 2,6 Гц, 1H), 8,73 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,26 (с, 1H), 7,28-7,23 (м, 1H), 4,44-4,39 м.д. (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,45, 153,13, 149,88, 148,60 (д, J=241,7 Гц), 146,76, 144,72, 130,30 (д, J=4,4 Гц), 129,26 (д, J=10,8 Гц), 126,08, 121,21, 114,60, 110,49, 108,68 (д, J=20,9 Гц), 105,71, 64,70, 64,52 м.д.;

МСВР (ИЭР): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrClFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 409,9702; обнаружено 409,9713.

(±)-транс-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7,8-диметил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-JGK059).

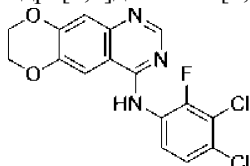


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,376 (с, 1H), 7,375 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,08-3,98 (м, 2H), 1,451 (д, J=6,1 Гц, 3H), 1,448 м.д. (д, J=6,1 Гц, 3H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,90, 153,12, 150,12 (д, J=242,5 Гц), 149,90, 146,59, 144,65, 128,70 (д, J=10,2 Гц), 127,18, 125,30 (д, J=4,5 Гц), 121,74, 113,84, 110,43, 108,57 (д, J=19,2 Гц), 105,31, 75,31, 75,05, 17,23, 17,20 м.д.;

МСВР (ИЭР): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 404,0404; обнаружено 404,0405.

N-(3,4-Дихлор-2-фторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK060).



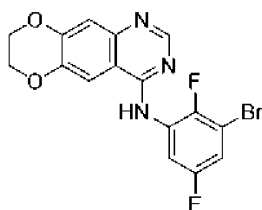
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,67 (с, 1H), 8,59 (т, J=8,6 Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,38 (уш, 1H), 7,33 (дд, J=9,1, 2,1 Гц, 1H), 7,31 (с, 1H), 4,45-4,38 м.д. (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,84, 153,08, 149,98 (д, J=246,3 Гц), 149,88, 146,42, 144,67, 127,55, 127,19 (д, J=10,0 Гц), 125,30 (д, J=4,1 Гц), 121,05, 120,47 (д, J=18,2 Гц), 114,36, 110,43, 105,97, 64,71, 64,51 м.д.;

МСВР (ИЭР): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 366,0207; обнаружено 366,0207.

N-(3-Бром-2,5-дифторфенил)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK061).



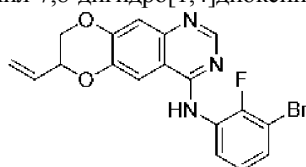


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,65 (с, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,63-7,54 (м, 2H), 7,21 (с, 1H), 4,45-4,37 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,29 (д,  $J=243,5$  Гц), 156,84, 152,93, 149,97 (д,  $J=242,9$  Гц), 149,43, 146,16, 143,81, 129,22-128,44 (м), 116,30 (д,  $J=26,7$  Гц), 113,99 (д,  $J=25,7$  Гц), 112,53, 109,73, 108,76 (дд,  $J=22,5, 12,5$  Гц), 108,33, 64,52, 64,15 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$ , 393,9997; обнаружено 393,9988.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-этинил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин ((±)-JGK062).



$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,65 (дд,  $J=8,2, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (дд,  $J=8,0, 6,4, 1,5$  Гц, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 5,95 (дд,  $J=17,3, 10,7, 5,8$  Гц, 1H), 5,60 (дт,  $J=17,3, 1,2$  Гц, 1H), 5,48 (дт,  $J=10,7, 1,1$  Гц, 1H), 4,82-4,74 (м, 1H), 4,42 (дд,  $J=11,5, 2,5$  Гц, 1H), 4,09 м.д. (дд,  $J=11,6, 8,1$  Гц, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,90, 153,38, 150,14 (д,  $J=242,4$  Гц), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (д,  $J=10,3$  Гц), 127,24, 125,30 (д,  $J=4,7$  Гц), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (д,  $J=19,3$  Гц), 106,06, 74,03, 67,84 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$ , 402,0248; обнаружено 402,0233.

Пример 4. Биоактивность и протокол анализа иллюстративных соединений.

Анализ бесклеточной киназы EGFR выполняли с использованием системы киназ EGFR (Promega #V3831). 13 концентраций при 2-кратных разведениях от 250 до 0,03052 нМ, без контроля лекарственного средства и без ферментного контроля использовали в дубликатах на 25 нг фермента EGFR на реакцию. Анализ киназы ADP-Glo (Promega #V6930) использовали для измерения активности EGFR в присутствии ингибиторов.

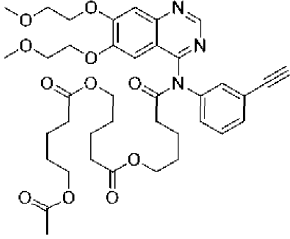
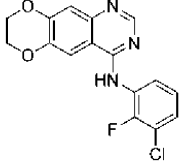
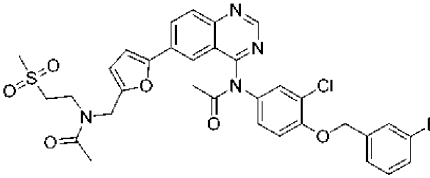
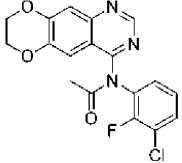
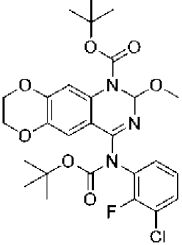
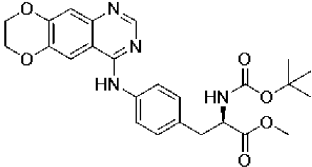
Анализы  $\text{GI}_{50}$  проводили с использованием полученных от пациента клеток глиобластомы. 13 концентраций при 2-кратных разведениях от 40000 до 9,77 нМ (для линий GBM) или от 4000 до 0,977 нМ (для линий рака легкого (HK031)) высевали на 384-луночные планшеты в четырех повторностях по 1500 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 3 дней, а затем пролиферацию оценивали с помощью Cell Titer Glo (Promega #G7570). В качестве эталона эрлотиниб характеризовался  $\text{GI}_{50}$  642 нМ (HK301) и 2788 нМ (GBM39).

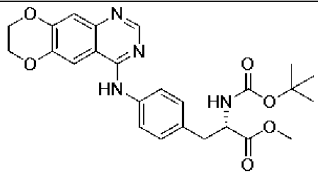
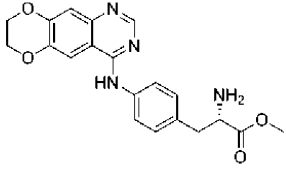
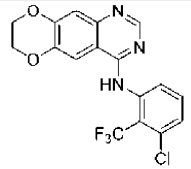
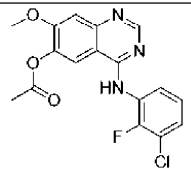
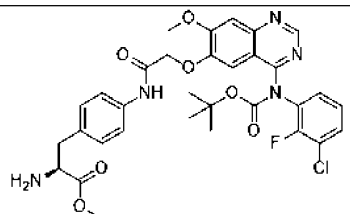
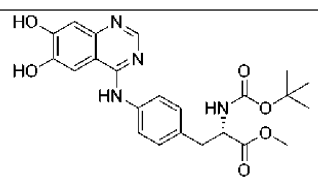
Фармакокинетические исследования проводили на самцах мышей CD-1 в возрасте 8-10 недель. Мышам вводили дозы, указанные в дубликатах. В определенные моменты времени получали цельную кровь путем ретроорбитального кровотечения и собирали ткань головного мозга. Образцы крови центрифугировали для получения плазмы крови, а ткань головного мозга промывали и гомогенизировали. Образцы экстрагировали ацетонитрилом и надосадочную жидкость сушили с помощью скоростного вакуума. Высушенные образцы растворяли в смеси ацетонитрил:вода:муравьиная кислота в соотношении 50:50:0,1 и количественно определяли на трехквартупольной ЖХ/МС Agilent серии 6400.

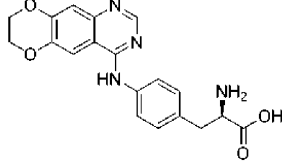
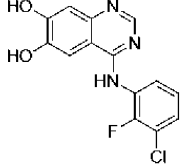
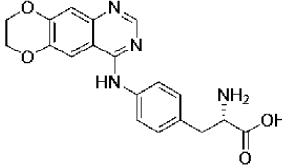
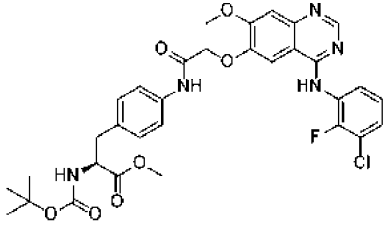
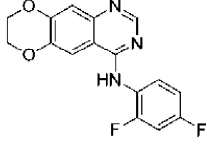
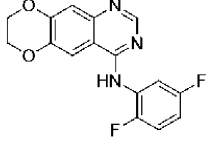
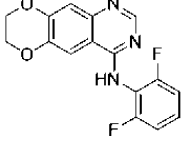
Таблица 2

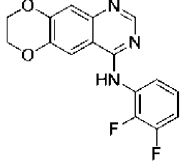
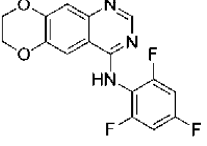
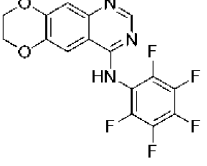
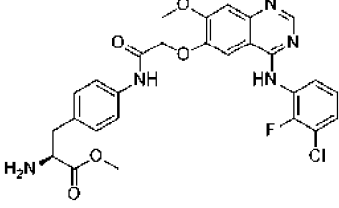
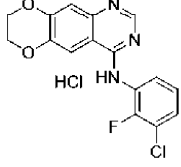
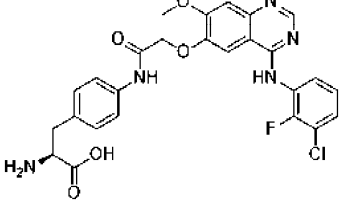
## Активность иллюстративных соединений

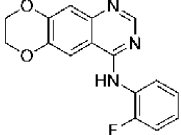
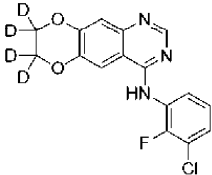
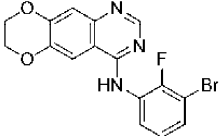
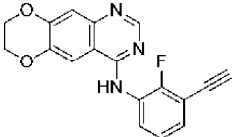

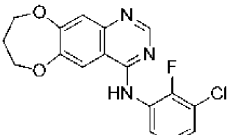
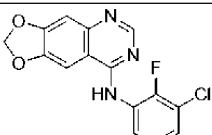
Номер	Структура	HK301 GI <sub>50</sub> (нМ)	GBM39 GI <sub>50</sub> (нМ)
JGK001		2214	19670
JGK002		5448	19820
JGK003		1127	23110
JGK004		23383	102690
JGK005		8824	20536
JGK006		11012	51380
JGK007		92147	-
JGK008		81269	-

JGK009		6096	14640
JGK010		780,5	2594
JGK011		9206	3252
JGK001 2		5477	10820
JGK013		1551	219870
JGK014		11816	27914

JGK015		2154	11540
JGK016		4052	61593
JGK017		64235	97624
JGK018		1071	4543
JGK019		-	-
JGK020		29236	36179

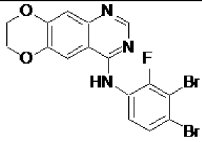
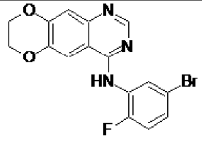
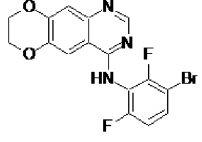
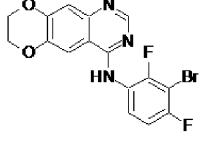
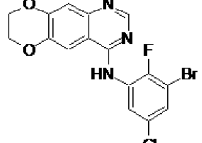
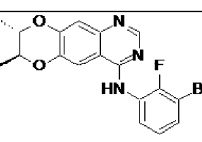
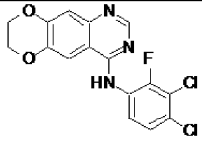

JGK021		480850	555780
JGK022		31116	150164
JGK023		86230	96260
JGK024		156370	124940
JGK025		10659	27706
JGK026		6124	16525
JGK027		5807	11837

JGK028		1688	5572
JGK029		24395	33970
JGK030		558742	961204
JGK031		-	-
JGK032		780,5	2594
JGK033		-	-

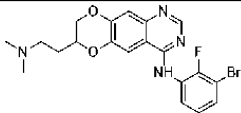
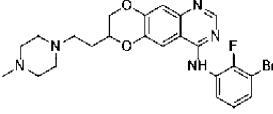
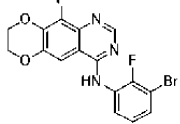
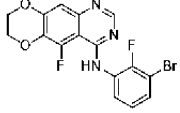
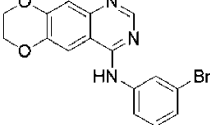
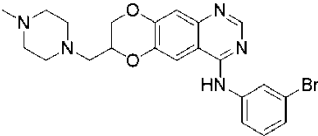
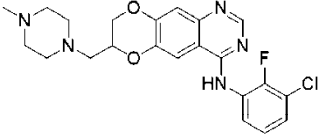
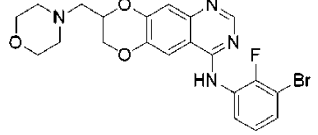
JGK035		4040	10721
JGK036		1046	4507
JGK037		329,3	1116
JGK038		791,1	2946
JGK039		3614	7820
JGK040		1721	7115
JGK041		1658	6042

JGK042		2294	4521
JGK043		745	1778
JGK044		4522	5635
JGK045		3940	10939
JGK047		316000	-
JGK050		1159	3568
JGK051		8253	24140
JGK052		3866	9219
JGK053		2778	5277



JGK054		5723	7697
JGK055		290,1	966,4
JGK056		418,7	1355,8
JGK057		1382,7	9361,5
JGK058		1852,7	12974
JGK059		8110	11218
JGK060		2947	3501
JGK061		1131	1727

JGK062		3784	5856
JGK063		816	3431
JGK064		1213	4005
JGK065		3432	7339
JGK066		734	2395
JGK067		898	2198
JGK068		577	1613
JGK068 S		439,7	1212
JGK068 R		1396	3384

JGK069		659	2165
JGK070		1405	3333
JGK071		5749	10256
JGK072		5017	12033
JGK073		2055	6073
JGK074		2276	6670
JGK075		1181	4005
JGK076		6161	16944

JGK077		6844	16733
JGK078		2034	5758
JGK079		7214	15709
JGK080		7374	14528
JGK081		-	-
JGK082 S		1668	1892
JGK083 S		529	841
JGK066 S		301	2633

JGK084		1835	5638
JGK085		1015	2617
JGK086		2559	4453
JGK087		3741	5257
JGK088		2132	4061
JGK089		3162	5090
JGK090		2394	4330

Пример 5. Связывание белка эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению.

Ниже в табл. 3 проиллюстрировано связывание белка эрлотиниба и нескольких иллюстративных соединений по изобретению.  $F_u$  относится к "несвязанной фракции".  $K_{ru}$  относится к "коэффициенту несвязанного распределения головного мозга и плазмы крови в состоянии равновесия".

Таблица 3

Связывание белка эрлотиниба и иллюстративных соединений по изобретению

Соединение	$F_u$ (кровь)/ $F_u$ (головной мозг)	Связанное (кровь)/(головной мозг)	$K_{ru}$ (Avg)
Эрлотиниб	4,88%	95,12%	0,0513
	2,93%	97,07%	
AZD3759	5,20%	94,80%	0,802
	1,44%	98,56%	
JGK005	1,35%	98,65%	0,491
	1,02%	98,98%	

JGK038	1,30%	98,70%	0,575
	0,89%	99,11%	
JGK028	1,44%	98,56%	1,037
	1,41%	98,59%	
JGK010	1,12%	98,88%	1,045
	1,10%	98,90%	
JGK037	1,70%	98,30%	1,301
	1,04%	98,96%	
JGK042	1,85%	98,15%	1,033
	1,14%	98,86%	
JGK063	8,04%	91,96%	0,341
	3,78%	96,22%	
JGK066	7,04%	92,96%	1,175
	3,02%	96,98%	
JGK068	6,31%	93,69%	1,184
	2,11%	97,89%	
JGK068S	5,96%	94,04%	1,181
	1,86%	98,14%	
JGK068R	5,33%	94,67%	1,046
	1,57%	98,43%	
JGK083S	7,02%	92,98%	0,798
	2,42%	97,58%	

Пример 6. Классификация пациентов с метаболической реакцией и без метаболической реакции на EGFRi.

Были охарактеризованы изменения в потреблении глюкозы с острым ингибированием EGFR в 19 клеточных линиях GBM, полученных от пациентов. Клетки культивировали в бессывороточной среде с добавками в виде глиомасфер, которые, в отличие от условий культивирования на основе сыворотки, сохраняют многие молекулярные особенности опухолей пациентов. Обработка ингибитором тирозинкиназы EGFR (EGFRi) эрлотинибом выявила подмножество GBM, у которых поглощение радиоактивно меченой глюкозы ( $^{18}\text{F}$ -FDG) было значительно ослаблено ингибированием EGFR; в дальнейшем называемые "пациентами с метаболической реакцией" (фиг. 21A и 27A). Подавление EGFR с использованием миРНК подтвердило, что снижение поглощения глюкозы не было связано с нецелевыми эффектами эрлотиниба (фиг. 27B, 27C). Снижение поглощения  $^{18}\text{F}$ -FDG клетками, обработанными EGFRi, было связано со снижением выработки лактата, потребления глюкозы и скорости внеклеточного закисления (ECAR), но уровни глутамина оставались неизменными (фиг. 21B и 27D-27G). Наконец, снижение утилизации глюкозы коррелировало с нарушениями передачи сигналов RAS-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, каждый из которых может регулировать метаболизм глюкозы при GBM и других видах рака (фиг. 28A).

Напротив, у всех "пациентов без метаболической реакции" с GBM (т.е. отсутствие изменений в поглощении  $^{18}\text{F}$ -FDG с EGFRi или миРНК) (фиг. 21A и 27B, 27C) не наблюдалось изменений в потреблении глюкозы, выработке лактата и ECAR, несмотря на сильное ингибирование EGFR (фиг. 21B, 27D-27G и 28B). Более того, передача сигналов RAS-MAPK и PI3K-AKT-mTOR в этих клетках в значительной степени не затрагивалась (фиг. 28B). Примечательно, что в то время как все пациенты с метаболической реакцией имели изменения в EGFR (увеличение числа копий, мутация), 6 линий GBM без метаболической реакции также содержали мутации EGFR и/или увеличение числа копий (фиг. 29A, 29B). Вместе эти данные иллюстрируют два ключевых момента. Во-первых, срочное ингибирование EGFR быстро снижает утилизацию глюкозы в подмножестве первичных клеток GBM, а во-вторых, генетические изменения в EGFR не могут сами по себе предсказать, какие GBM имеют метаболическую реакцию на EGFRi.

Пример 7. Клетки с метаболической реакцией на EGFRi примированы для апоптоза.

Нарушения метаболизма глюкозы могут индуцировать экспрессию проапоптозных факторов и стимулировать внутренний апоптоз, предполагая, что снижение поглощения глюкозы в ответ на EGFRi будет стимулировать внутренний путь апоптоза. Действительно срочная обработка эрлотинибом способствовала экспрессии проапоптозных белков только BИЗ, BИМ и PUMA, только в культурах клеток с метаболической реакцией (фиг. 30A). Однако окрашивание аннексином V показало, что у пациентов с мета-

большой реакцией был лишь умеренный (~17%), хотя и значительно более высокий, апоптоз по сравнению с пациентами без метаболической реакции (~3%) после 72 ч воздействия эрлотиниба (фиг. 21С).

Низкий уровень апоптоза, несмотря на выраженную индукцию проапоптотических факторов, заставил авторов изобретения задаться вопросом, не "примирует" ли нарушение поглощения глюкозы с помощью EGFRi клетки GBM для апоптоза; таким образом увеличивая склонность к апоптозу, не вызывая значительной гибели клеток. Чтобы исследовать это, авторы изобретения обрабатывали эрлотинибом как клетки с метаболической реакцией, так и клетки без метаболической реакции в течение 24 ч и выполнили динамическое профилирование ВНЗ для количественной оценки изменений в праймировании апоптоза (фиг. 30В). Используя несколько пептидов ВНЗ (например, BIM, BID и PUMA), мы наблюдали значительное увеличение праймирования апоптоза, как определено по изменению высвобождения цитохрома с относительно носителя, у клеток с метаболической реакцией с обработкой эрлотинибом (фиг. 21D - темно-серые столбцы). Важно отметить, что праймирование у клеток с метаболической реакцией было значительно выше, чем праймирование у клеток без метаболической реакции (фиг. 21D - светло-серые столбцы), подтверждая предположение, что ослабление поглощения глюкозы с помощью EGFRi запускает праймирование апоптоза в GBM.

Авторы изобретения исследовали, требуется ли пониженное поглощение глюкозы для праймирования апоптоза с помощью EGFRi, проверив, должно ли снижение потребления глюкозы смягчить эти эффекты. Для исследования этого переносчики глюкозы 1 (GLUT1) и 3 (GLUT3) эктопически экспрессировались в двух клетках с метаболической реакцией (HK301 и GBM39). Усиленная экспрессия GLUT1 и GLUT3 (GLUT1/3) восстанавливала EGFRi-опосредованное ослабление поглощения глюкозы и выработки лактата в обеих клеточных линиях (фиг. 21Е и 31А-31С) и, что важно, заметно подавляла праймирование апоптоза в ответ на EGFRi (фиг. 21F). В совокупности эти данные демонстрируют, что EGFRi-опосредованное ингибирование потребления глюкозы, хотя и недостаточное для индукции значительной гибели клеток, снижает порог апоптоза, потенциально делая клетки GBM уязвимыми для агентов, которые используют это праймированное состояние.

Пример 8. Цитоплазматический p53 необходим для праймирования апоптоза с помощью EGFRi.

Был исследован механизм, с помощью которого GBM становятся праймированными для апоптоза с помощью EGFRi. Ингибирование метаболизма глюкозы, вызванного онкогенами, делает клетки GBM синергически восприимчивыми к цитоплазматическому p53-зависимому апоптозу. Ослабленный метаболический поток глюкозы в GBM посредством нацеливания на онкогенную передачу сигналов (например, EGFRi) приводит к тому, что цитоплазматический p53 вовлекается во внутренний путь апоптоза ("праймирование"). Однако Bcl-xL блокирует гибель клеток, опосредованную цитоплазматическим p53. Фармакологическая стабилизация p53 преодолевает этот блок апоптоза, что приводит к взаимоусиливающей летальности с комбинированным нацеливанием на метаболизм глюкозы, вызванный онкогенами, при GBM.

В клетках, которые находятся в праймированном состоянии, антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) в значительной степени загружены проапоптотическими белками ВНЗ (например, BIM, BID, PUMA, BAD, NOXA, HRK); следовательно, выживание клеток зависит от этих взаимодействий. Белок-супрессор опухолей, p53, как известно, активирует проапоптотические белки, которые впоследствии необходимо связывать антиапоптотическими белками Bcl-2 для предотвращения гибели клеток. Чтобы проверить, необходим ли p53 для EGFRi-индуцированного праймирования, мы подавляли p53 с помощью CRISPR/CAS-9 (далее обозначаемого как P53KO) у двух пациентов с метаболической реакцией (HK301 и HK336, фиг. 22А). В то время как изменение потребления глюкозы с помощью EGFRi не было затронуто в клетках P53KO (фиг. 32А), профилирование ВНЗ показало, что P53KO почти устраняет индуцированное эрлотинибом праймирование апоптоза как в клетках HK301, так и в HK336 (фиг. 22В).

Поскольку было показано, что транскрипционная активность p53 усиливается при ограничении глюкозы, мы провели исследование, чтобы определить, индуцируется ли опосредованная p53 транскрипция посредством EGFRi. Однако эрлотиниб не увеличивал экспрессию регулируемых p53 генов (например, p21, MDM2, PIG3, TIGAR) (фиг. 32В) и не индуцировал репортерную активность p53-люциферазы в клетках HK301 пациента с метаболической реакцией (фиг. 32С). Эти данные показывают, что, хотя p53 необходим для праймирования с помощью EGFRi, его транскрипционная активность может не быть необходимой.

В дополнение к хорошо описанным ядерным функциям p53 p53 может локализоваться в цитоплазме, где он может напрямую взаимодействовать с внутренним путем апоптоза. Чтобы оценить, важен ли цитоплазматический p53 для праймирования апоптоза с помощью EGFRi, мы стабильно вводили мутант p53 с дефектным клеточным сигналом внутриядерной локализации (p53<sup>cyto</sup>) в глиомасферы HK301 и HK336 P53KO. Как и ожидалось, p53<sup>cyto</sup> экспрессировался (фиг. 22С и 32D), ограничивался цитоплазмой (фиг. 22D и 32Е) и не имел транскрипционной активности (фиг. 22Е и 32F). Напротив, восстановление p53 дикого типа (p53<sup>wl</sup>) в клетках HK301 и HK336 P53KO обнаруживало локализацию, аналогичную родительским клеткам, и спасало транскрипцию генов, регулируемых p53 (фиг. 22С-22Е и 32Е-32G). Примечательно, что стабильное введение p53<sup>cyto</sup> значительно восстанавливало праймирование с помощью эрлотиниба в клетках HK301 и HK336 P53KO до уровней, сравнимых с p53<sup>wl</sup> (фиг. 22F и 32G), указывая

на то, что цитоплазматическая функция p53 необходима для EGFRi-опосредованного праймирования. В подтверждение этого введение транскрипционно активного (фиг. 22G), но ограниченного в ядре мутанта p53 (p53<sup>NES</sup>) в клетки НК301 P53KO не смогло вызвать EGFRi-опосредованное праймирование апоптоза (фиг. 22G, 22H и 32H). Наконец, фармакологическое ингибирование цитоплазматической активности p53 с помощью пифитрина-μ (PFTμ) заметно снижает праймирование с помощью эрлотиниба (фиг. 32I). В совокупности эти результаты показывают, что цитоплазматический p53 задействует внутренний механизм апоптоза после EGFRi в GBM.

Предыдущие исследования продемонстрировали, что мутанты p53, полученные из опухоли человека, особенно в ДНК-связывающем домене, помимо недостатков трансактивации, снижают цитоплазматические функции. Таким образом, авторы изобретения исследовали, будет ли стабильная экспрессия двух из этих "горячих точек" мутантов p53, R175H или R273H, в НК301 P53KO снижать EGFRi-опосредованное праймирование (фиг. 32H). Как и ожидалось, оба мутанта не обладали способностями к транскрипции (фиг. 22G) и, в соответствии со сниженной цитоплазматической активностью, были неспособны к праймированию апоптоза с помощью EGFRi (фиг. 22H). Следовательно, в соответствии с предыдущими открытиями, онкогенные мутации в ДНК-связывающем домене p53 приводят к "двойным ударам", в результате чего как трансактивация, так и цитоплазматические функции отменяются, последнее имеет значение для праймирования апоптоза с помощью EGFRi.

Пример 9. Ингибирование поглощения глюкозы, вызванного EGFR, создает пригодную для использования зависимость Vcl-xL.

Vcl-xL может изолировать цитоплазматический p53 и предотвращать p53-опосредованный апоптоз; тем самым создавая состояние праймирования апоптоза и зависимость выживания от Vcl-xL. Действительно профилирование ВНЗ выявило зависимость от Vcl-xL для выживаемости клеток у пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 33A). Таким образом, мы предположили, что снижение потребления глюкозы с помощью EGFRi может привести к секвестрации цитоплазматического p53 с помощью Vcl-xL. Чтобы исследовать это, мы выполнили коиммунопреципитацию, чтобы изучить динамику взаимодействий p53-Vcl-xL в ответ на EGFRi как у пациентов с реакцией (n=2), так и у пациентов без реакции (n=2). Важно отметить, что мы наблюдали заметно усиление взаимодействий Vcl-xL и p53 после обработки эрлотинибом у пациентов с метаболической реакцией (фиг. 23A), а не у пациентов без метаболической реакции (фиг. 23B). Это предполагает, что ингибирование EGFR-зависимого потребления глюкозы приводит к секвестрации p53 с помощью Vcl-xL. В соответствии с этой интерпретацией эктопическая экспрессия GLUT1/3, которая восстанавливает EGFRi-опосредованное снижение поглощения глюкозы и праймирование апоптоза, предотвращает связывание p53 с Vcl-xL (фиг. 23C и 33B). Эти данные убедительно показывают, что EGFRi-опосредованное ингибирование поглощения глюкозы подготавливает GBM-клетки к апоптозу, способствуя взаимодействию между цитоплазматическим p53 и Vcl-xL.

Высвобождение p53 из Vcl-xL позволяет p53 напрямую активировать BAX, что приводит к высвобождению цитохрома c и гибели клеток. Как только мы обнаружили повышенное связывание между Vcl-xL и p53 в метаболических ответчиках в ответ на EGFRi, мы спросили, вызывает ли смещение p53 из Vcl-xL апоптоз. Для исследования этого, мы обрабатывали клетку с метаболической реакцией (НК301) эрлотинибом и специфическим ингибитором Vcl-xL, WENI-539. Добавление WENI-539 нарушило ассоциацию Vcl-xL с p53 при лечении эрлотинибом (фиг. 23D), что привело к синергетической летальности для клеток НК301 и GBM39 (пациенты с метаболической реакцией) (фиг. 23E). Примечательно, что цитоплазматический p53 был достаточным для комбинаторных эффектов в клетках с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 33C). Однако WENI-539 не усиливал апоптоз у пациентов без метаболической реакции (НК393), получавших эрлотиниб, что позволяет предположить, что ослабление поглощения глюкозы с помощью EGFRi и последующее связывание между p53 и Vcl-xL необходимы для создания зависимости от Vcl-xL для выживания (фиг. 33E). В подтверждение этого принудительная экспрессия GLUT1/3 значительно уменьшала гибель клеток с помощью комбинации лекарственных средств (фиг. 23F и 33D). Вместе эти наблюдения показывают, что Vcl-xL ослабляет гибель клеток GBM в ответ на EGFRi-опосредованное ингибирование поглощения глюкозы путем секвестрации цитоплазматического p53 (фиг. 32G).

Пример 10. Комбинированное нацеливание на EGFR и p53 является синергическим для пациентов с метаболической реакцией на EGFRi.

Исследования механизма действия выявили потенциальную терапевтическую возможность в GBM, вызванных EGFR, которая будет зависеть от функционального p53. В то время как ось передачи сигналов p53 является одним из трех основных путей, измененных при GBM, анализ набора данных TCGA для GBM продемонстрировал, что мутации p53 являются взаимоисключающими с изменениями в EGFR (фиг. 28A и 28B). Напротив, у пациентов с мутациями или накоплением EGFR путь p53 может быть подавлен посредством амплификации MDM2 и/или делеций в негативном регуляторе MDM2, p14 ARF, в локусе CDKN2A. Учитывая эти отношения и потребность в p53 для праймирования при поглощении глюкозы, ослабленном EGFRi, мы предположили, что стабилизация p53 посредством ингибирования MDM2 может иметь терапевтические эффекты, аналогичные антагонизму Vcl-xL. Используя нутлин, широко изученный ингибитор MDM2, мы обнаружили поразительную взаимоусиливающую летальность в комбинации с эрлотинибом в глиомасфере пациента с метаболической реакцией. Более 90% клеток



НК301 подверглись апоптозу комбинацией эрлотиниба и нутлина (фиг. 24С). Примечательно, что мы не наблюдали синергизма между этими лекарственными средствами у пациента без метаболической реакции (GS017, фиг. 24С). Затем мы протестировали эту комбинацию на нашей панели первичных клеток GBM (все p53 дикого типа) и обнаружили взаимоусиливающую летальность только в GBM с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 24D и 34A). Генетический нокадаун EGFR подтвердил синергизм только у пациентов с метаболической реакцией (фиг. 34B). Важно отметить, что вызванная искусственно экспрессия GLUT1/3 значительно снизила олигермизацию BAX, высвобождение цитохрома с и апоптоз при комбинации эрлотиниба и нутлина (фиг. 24E и 34С), подтверждая идею, что ингибирование метаболизма глюкозы с помощью EGFRi необходимо для синергических эффектов комбинации эрлотиниба и нутлина.

Затем была исследована роль p53 в индукции гибели клеток при комбинации эрлотиниба и нутлина. Как и ожидалось, нацеливание CRISPR/CAS-9 на p53 в двух клетках с метаболической реакцией на EGFRi (НК301 и НК336) полностью снижало чувствительность к комбинации лекарственных средств (фиг. 24F). Аналогично экспонированная экспрессия Bcl-xL заметно подавляла гибель клеток при комбинированной обработке, что согласуется с важной функцией Bcl-xL в противодействии апоптозу, опосредованному p53 (фиг. 34D). Более того, аналогично результатам с ингибированием Bcl-xL (например, WENI-539), добавление нутлина высвобождало p53 из Bcl-xL при обработке эрлотинибом (фиг. 24G). Эти данные согласуются с предыдущими наблюдениями о том, что стабилизация p53 может стимулировать цитоплазматический p53-опосредованный апоптоз. В подтверждение предположения о том, что цитоплазматическая активность p53 необходима для EGFRi и индуцированного нутлином апоптоза у пациентов с метаболической реакцией, блокирование цитоплазматической активности p53 с помощью PFT $\mu$  значительно снизило синергические эффекты комбинации (фиг. 34E), в то время как клетки НК301, содержащие ограниченный ядром мутант p53, p53<sup>NES</sup>, были неспособны к усилению апоптоза с помощью эрлотиниба и нутлина (фиг. 34F). Наконец, мутанты "горячей точки" рака, R175H и R273H, которые обладают как трансактивацией, так и цитоплазматической недостаточностью, были полностью нечувствительны к комбинации лекарственных средств (фиг. 34F).

Хотя желательно, чтобы цитоплазматический p53 способствовал гибели клеток с помощью комбинации лекарственных средств, мы наблюдали в некоторых случаях, что как транскрипционнозависимые, так и независимые функции p53 необходимы для оптимального выполнения синергического апоптоза с помощью нутлина (фиг. 34F). Эти результаты согласуются с отчетами о том, что независимые от транскрипции функции p53 могут самостоятельно выполнять внутренний апоптоз, тогда как в других контекстах могут потребоваться его зависимые от транскрипции функции для стимуляции опосредованного цитоплазматическим p53 уничтожения клеток. В совокупности описанные в данном документе результаты показывают, что комбинированное нацеливание на EGFR-вызванный метаболизм глюкозы и p53 может вызывать заметную синергическую гибель клеток в первичной GBM; что зависит от цитоплазматических функций p53.

Пример 11. Модуляция метаболизма глюкозы вызывает у пациентов без метаболической реакции на EGFRi p53-опосредованную гибель клеток.

Вышеупомянутые данные побудили авторов изобретения предложить модель, в которой EGFRi-опосредованное ослабление метаболизма глюкозы запускает механизм апоптоза, приводя к синергизму с проапоптозными стимулами, такими как активация p53. Синергизм заключается между индукцией клеточного стресса ингибиторами EGFR, снижением поглощения глюкозы и примированием клетки для апоптозу и стабилизацией p53 антагонистами BCL-2. Ингибирование EGFR может быстро ослабить гликолиз при клеточном стрессе. Это создает опухолеспецифичную уязвимость, при которой внутренний апоптоз может быть значительно усилен 1) активацией p53 (например, через нутлин, аналоги или другие вещества, описанные в данном документе); и 2) ингибированием BCL-2 (любым из нескольких агентов, как описано в данном документе, таких как, например, АВТ-263 (Navitoclax)).

Логическое предсказание этой модели состоит в том, что прямое ингибирование метаболизма глюкозы должно делать фенокопии эффектов EGFRi. В соответствии с этим добавление метаболического ингибитора глюкозы 2-дезоксиглюкозы (2DG) стимулировало праймирование апоптоза, связывание p53 с Bcl-xL и синергизм с нутлином в клетках НК301 (пациент с метаболической реакцией на EGFRi) (фиг. 40A, 40B и 40D). Интересно, что ингибирование окислительного фосфорилирования олигомицином (комплекс V/АТФ-синтаза) или ротеноном (комплекс I) не действует синергически с обработкой нутлином в глиомасферах НК301 (фиг. 35С и 35D). Таким образом, только снижение метаболического потока глюкозы, но не окислительного метаболизма, оказывается достаточным для синергической чувствительности к активации p53.

Это побудило авторов изобретения задуматься о том, приводит ли модуляция потребления глюкозы у пациентов без метаболической реакции на EGFRi к аналогичной p53-зависимой уязвимости. Чтобы исследовать это, они проверили, вызывает ли прямое ингибирование поглощения глюкозы с помощью 2DG или нацеливание на PI3K (хорошо охарактеризованный фактор метаболизма глюкозы) праймирование апоптоза у двух пациентов без метаболической реакции на EGFRi (фиг. 25A). В отличие от обработки эрлотинибом, срочное ингибирование PI3K с помощью пиктилисиба отменяет передачу сигналов PI3K-AKT-mTOR (фиг. 35E) и значительно снижает поглощение <sup>18</sup>F-FDG клетками НК393 и НК254 (фиг. 25B). Сни-

жение потребления глюкозы с помощью пиктилисиба было связано со значительно более высоким праймированием апоптоза и, как и ожидалось, 2DG полностью отражал эти эффекты (фиг. 25B и 25C). Следовательно, клетки без метаболической реакции на EGFRi могут быть праймированы для апоптоза после ингибирования поглощения глюкозы. Важно отметить, что нацеливание CRISPR/CAS-9 на p53 в НК393 значительно подавляло праймирование, опосредованное 2DG или пиктилисибом (фиг. 25D). Более того, p53-зависимое праймирование было связано с повышенным связыванием Bcl-xL и p53, что указывает на разрушение p53 с помощью Bcl-xL для блокирования апоптоза (фиг. 25E и 35F). В соответствии с этой интерпретацией комбинирование 2DG или пиктилисиба с нутлином вызывало значительную p53-зависимую взаимоусиливающую летальность в клетках без метаболической реакции на EGFRi (фиг. 25F и 25G). Вместе эти данные демонстрируют, что срочное ингибирование метаболизма глюкозы, либо напрямую, либо с помощью нацеленной терапии, способствует p53-зависимому праймированию апоптоза при GBM; что создает целевую уязвимость для улучшенного уничтожения клеток.

Пример 12. Комбинаторная терапевтическая стратегия и неинвазивный биомаркер для нацеливания на GBM *in vivo*.

Результаты, полученные на клеточной культуре, показывают, что комбинированное нацеливание на онкоген-вызванный метаболизм глюкозы и p53 обладает синергической активностью в первичной GBM. Это побудило нас исследовать, может ли этот подход быть эффективным в моделях ортотопических ксенотрансплантатов GBM. Для этих исследований мы использовали мощный ингибитор MDM2, идасанутлин, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения многих злокачественных новообразований. Учитывая неопределенность проникновения идасанутлина в ЦНС, мы впервые продемонстрировали, что идасанутлин может накапливаться в головном мозге мышей с неповрежденным гематоэнцефалическим барьером (мозг: плазма крови, 0,35) и стабилизирует p53 у ортотопических мышей, несущих опухоль (фиг. 41A и 41B).

Далее, поскольку нарушения метаболизма глюкозы с ингибированием онкогенов необходимы для синергической чувствительности к активации p53, мы пришли к выводу, что быстрое ослабление поглощения глюкозы *in vivo* после введения EGFRi, измеряемое с помощью  $^{18}\text{F}$ -FDG PET, может служить неинвазивным прогностическим биомаркером для терапевтической эффективности комбинированной обработки эрлотиниб+идасанутлин (фиг. 26A). Мы наблюдали в ортотопических ксенотрансплантатах глиомасферы пациента с метаболической реакцией на EGFR (GBM39), что срочная обработка эрлотинибом (75 мг/кг) быстро снижала поглощение  $^{18}\text{F}$ -FDG (через 15 ч после введения эрлотиниба) (фиг. 26B и 36C). На отдельных группах мышей они тестировали отдельные лекарственные средства и комбинацию ежедневной обработки эрлотинибом (75 мг/кг) и идасанутлином (50 мг/кг). Относительно контроля с одним агентом мы наблюдали синергическое ингибирование роста, как определено с помощью секретируемой люциферазы *gaussia*, у мышей, несущих внутречерепную опухоль GBM39, с минимальной токсичностью (фиг. 26B и 36D). Напротив, ортотопические ксенотрансплантаты пациента без метаболической реакции (НК393) не показали ни изменений в поглощении  $^{18}\text{F}$ -FDG при срочном EGFRi (фиг. 26D и 36C), ни синергической активности при комбинации эрлотиниба и идасанутлина (фиг. 26E). Таким образом, неинвазивная ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -FDG, используемая для измерения быстрых изменений поглощения глюкозы с помощью EGFRi, была эффективна в прогнозировании последующей синергической чувствительности к комбинации эрлотиниба и идасанутлина.

Наконец, мы оценили влияние комбинации лекарственных средств на общую выживаемость в ортотопических ксенотрансплантатах либо двух пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (GBM39 и НК336), либо двух пациентов без метаболической реакции (НК393 и GS025). Все опухоли были p53 дикого типа (фиг. 29A). После доказательства роста опухоли (как определено с помощью люциферазы *gaussia*) мыши получали носитель, эрлотиниб, идасанутлин или комбинацию в течение до 25 дней. Комбинация лекарственных средств привела к выраженному увеличению выживаемости только в опухолях GBM пациентов с метаболической реакцией на EGFRi (фиг. 30F-30I). Вместе эти данные показывают, что комбинированное нацеливание на EGFR и p53 синергически ингибирует рост и продлевает выживаемость в подмножестве ортотопических ксенотрансплантатов GBM с p53 дикого типа. Важно отметить, что ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -FDG был ценным неинвазивным прогностическим биомаркером чувствительности к этой новой комбинированной терапевтической стратегии.

Пример 13. Прямое ингибирование гликолиза с помощью 2DG или цитохалазина В.

Было исследовано, как прямое ингибирование гликолиза с помощью ингибитора гексокиназы (2DG) и ингибитора переносчика глюкозы (цитохалазин В) влияет на активацию p53 нутлином. Результаты, показанные на фиг. 37, демонстрируют, что низкий уровень глюкозы (0,25 мМ) приводит к синергическому уничтожению клеток с ингибированием BCL-xL с помощью навитоклакса или нутлина. Гибель клеток определяли с использованием окрашивания аннексином V в образцах глиомасферы, обработанных в течение 72 ч гликолитическими ингибиторами 2DG или цитохалазином В в качестве отдельных агентов или в комбинации с активатором p53, нутлином. Те же эффекты были воспроизведены путем культивирования глиомасфер в условиях низкого содержания глюкозы (0,25 мМ) и обработки их нутлином или навитоклаксом (ABT-263) в течение 72 ч.

Пример 14. Экспериментальные процедуры.

## Мыши.

Самки NOD scid gamma (NSG) в возрасте 6-8 недель были приобретены в учреждении по разведению животных медицинского центра Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе (UCLA). Самцов мышей CD-1 в возрасте 6-8 недель приобретали в Charles River. Всех мышей содержали в определенных условиях без патогенной флоры, в одобренном AAALAC учреждении для животных Отделения лабораторных животных (DLAM) в UCLA. Все эксперименты на животных проводились с одобрения Управления по надзору за ресурсами животных Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе (OARO).

Клетки GBM, полученные от пациентов.

Вся ткань пациента для получения культур клеток GBM была получена на основе явного информированного согласия с использованием протокола UCLA Institutional Review Board (IRB): 10-00065. Как описано ранее, первичные клетки<sup>12</sup> GBM были созданы и поддержаны в условиях глиомасферы, состоящих из DMEM/F12 (Gibco), B27 (Invitrogen), пенициллин-стрептомицин (Invitrogen) и глутамакса (Invitrogen) с добавлением гепарина (5 мкг/мл, Sigma), EGF (50 нг/мл, Sigma) и FGF (20 нг/мл, Sigma). Все клетки выращивали при 37°C, 20% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> и регулярно контролировали и давали отрицательный результат на наличие микоплазмы с использованием коммерчески доступного набора (MycosAlert, Lonza). Во время экспериментов большинство используемых линий НК находились между 20-30 пассажами (за исключением НК385 p8, НК336 p15), в то время как линии GS и GBM39 имели менее 10 пассажей. Все клетки были аутентифицированы с помощью анализа коротких tandemных повторов (STR).

Реагенты и антитела.

Химические ингибиторы из следующих источников были растворены в ДМСО для исследований *in vitro*: эрлотиниб (Chemietek), нутлин-3А (Selleck Chemicals), WENI-539 (APExBIO), пиктилисиб (Selleck Chemicals), олигомицин (Sigma), ротенон (Sigma), 2DG (Sigma) растворяли в среде перед использованием. Антитела, используемые для иммуноблоттинга, были получены из перечисленных источников: β-актин (Cell signaling, 3700), тубулин (Cell signaling, 3873), p-EGFR Y1086 (Thermo Fischer Scientific, 36-9700), t-EGFR (Millipore, 06-847), t-AKT (Cell Signaling, 4685), p-AKT T308 (Cell Signaling, 13038), p-AKT S473 (Cell Signaling, 4060), t-ERK (Cell Signaling, 4695), p-ERK T202/Y204 (Cell Signaling, 4370), t-S6 (Cell Signaling, 2217), p-S6 S235/236 (Cell Signaling, 4858), t-4EBP1 (Cell Signaling, 9644), p-4EBP1 S65 (Cell Signaling 9451), Glut3 (Abcam, ab15311), Glut1 (Millipore, 07-1401), p53 (Santa Cruz Biotechnology, SC-126), BAX (Cell Signaling, 5023), BIM (Cell Signaling, 2933), Bcl-2 (Cell Signaling, 2870), Bcl-xL (Cell Signaling, 2764), Mcl-1 (Cell Signaling, 5453), цитохром c (Cell Signaling, 4272) и расщепленная каспаза-3 (Cell Signaling, 9661). Антитела, используемые для иммунопреципитации, были получены из перечисленных источников: p53 (Cell Signaling, 12450) и Bcl-xL (Cell Signaling, 2764). Вторичные антитела были получены из перечисленных источников: антитела против IgG кролика, связанные с HRP (Cell Signaling, 7074), и антитела против IgG мыши, связанные с HRP (Cell Signaling, 7076). Все антитела для иммуноблоттинга использовали в разведении 1:1000, за исключением β-актина и тубулина, которые использовали в соотношении 1:10 000. Антитела для иммунопреципитации разводили в соответствии с инструкциями производителя (1:200 для p53 и 1:100 для Bcl-xL). Вторичные антитела использовали в разведении 1:5000.

Анализ поглощения <sup>18</sup>F-фтордезоксиглюкозы (<sup>18</sup>F-FDG).

Клетки высевали из расчета 5×10<sup>4</sup> клеток/мл и обрабатывали назначенными лекарственными средствами в указанные моменты времени. После соответствующей обработки клетки собирали и ресуспендировали в не содержащей глюкозу среде DMEM/F12 (USBiological), содержащей <sup>18</sup>F-FDG (радиоактивность 1 мКи/мл). Клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч, а затем трижды промывали ледяным PBS. Затем измеряли радиоактивность каждого образца с помощью счетчика гамма-излучения.

Измерения глюкозы, глутамин и лактата.

Потребление клетками глюкозы и продуцирование лактата измеряли с помощью основной программы анализатора Nova Biomedical BioProfile. Вкратце клетки высевали из расчета 1×10<sup>5</sup> клеток/мл в 2 мл условий глиомасферы и соответствующих условий лекарственного средства (n=5). Через 12 ч после обработки лекарственным средством из каждого образца удаляли 1 мл среды и анализировали в анализаторе Nova BioProfile. Измерения были нормализованы по количеству клеток.

Анализ апоптоза с помощью аннексина V.

Клетки собирали и анализировали на окрашивание аннексином V и PI в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Вкратце клетки высевали из расчета 5×10<sup>4</sup> клеток/мл и обрабатывали соответствующими лекарственными средствами. В указанные моменты времени клетки собирали, обрабатывали трипсином, промывали PBS и окрашивали аннексином V и PI в течение 15 мин. Затем образцы анализировали с помощью проточного цитометра BD LSR II.

Иммуноблоттинг.

Клетки собирали и лизировали в буфере RIPA (Boston BioProducts), содержащем протеазу Halt и ингибитор фосфатазы (Thermo Fischer Scientific). Лизаты центрифугировали при 14000 об. в течение 15 мин при 4°C. Затем образцы белка кипятили в буфере для образцов NuPAGE LDS (Invitrogen) и восстанавливающим агенте для образцов NuPAGE (Invitrogen), разделяли с помощью SDS-PAGE на 12%

Bis-Tris гелях (Invitrogen) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare). Иммуноблоттинг выполняли в соответствии с указаниями производителя антител и, как упоминалось ранее. Мембраны были разработаны с использованием системы SuperSignal (Thermo Fischer Scientific).

Иммунопреципитация.

Клетки собирали, один раз промывали PBS и инкубировали в буфере для лизиса IP (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% NP-40, 5% глицерина) при 4°C в течение 15 мин. Затем 300-500 мкг каждого образца предварительно очищали в гранулах с агарозой Protein A/G Plus (Thermo Fischer Scientific) в течение 1 ч. После предварительной очистки образцы затем инкубировали с конъюгатами антитело-гранулы в течение ночи в соответствии с указаниями производителя и как упоминалось выше. Затем образцы центрифугировали при 1000 g в течение 1 мин, и гранулы пять раз промывали 500 мкл буфера для лизиса IP. Белки элюировали из гранул кипячением в 2× буфере для образцов LDS (Invitrogen) при 95°C в течение 5 мин. Образцы анализировали с помощью иммуноблоттинга, как описано выше. Антитела для иммунопреципитации разводили в соответствии с инструкциями производителя (1:200 для p53 и 1:100 для Bcl-xL).

Динамическое профилирование ВНЗ.

Глиомасферы GBM сначала были разделены на одноклеточные суспензии с помощью TrypLE (Gibco) и ресуспендированы в буфере МЕВ (150 mM маннита, 10 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 0,02 mM EGTA, 0,02 mM ЭДТА, 0,1% BSA, 5 mM сукцината). 50 мкл клеточной суспензии ( $3 \times 10^4$  клеток/лунка) помещали в лунки, содержащие 50 мкл буфера МЕВ, содержащего 0,002% дигитонина и указанных пептидов, в 96-луночные планшеты. Затем планшеты инкубировали при 25°C в течение 50 мин. Затем клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин с последующей нейтрализацией буфером N2 (1,7 M Tris, 1,25 M глицин, pH 9,1) в течение 5 мин. Образцы окрашивали в течение ночи с помощью 20 мкл окрашивающего раствора (10% BSA, 2% Tween 20 в PBS), содержащего DAPI и антицитохром с (BioLegend). На следующий день высвобождение цитохрома с определяли количественно с помощью проточного цитометра BD LSRII. Измерения были нормализованы до соответствующих контролей, которые не способствуют высвобождению цитохрома с (ДМСО и неактивный пептид PUMA2A). Дельта-праймирование относится к разнице в количестве высвобождения цитохрома с между клетками, обработанными носителем, и клетками, обработанными лекарственным средством.

Олигомеризация ВАХ.

$7,5 \times 10^5$  клеток обрабатывали указанными лекарственными средствами. Через 24 ч после обработки клетки собирали, один раз промывали ледяным PBS и ресуспендировали в 1 mM бисмалеимидогексане (ВМН) в PBS в течение 30 мин. Затем клетки осаждали и лизировали для иммуноблоттинга, как описано выше.

Обнаружение цитохрома с 5 млн клеток высевали при концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/мл и обрабатывали указанными лекарственными средствами. Через 24 ч после обработки клетки собирали, один раз промывали ледяным PBS. Затем проводили субклеточное фракционирование с использованием набора для выделения митохондрий (Thermo Fischer Scientific, 89874). И цитоплазматические, и митохондриальные фракции подвергали иммуноблоттингу и цитохром с обнаруживали с использованием антитела к цитохрому с в разведении 1:1000 (Cell Signaling, 4272).

Исследования ксенотрансплантата мышей.

Для внутричерепных экспериментов клетки GBM39, НК336, НК393 и GS025 вводили ( $4 \times 10^5$  клеток на инъекцию) в правое полосатое тело головного мозга самок мышей NSG (возраст 6-8 недель). Координаты инъекции были 2 мм вбок и 1 мм сзади от брегмы на глубине 2 мм. Массу опухоли контролировали с помощью секретируемой люциферазы gaussia, и после трех последовательных измерений роста мышей рандомизировали в четыре группы лечения, состоящие из соответствующих носителей, 75 мг/кг эрлотиниба, 50 мг/кг идасанутлина или комбинации обоих лекарственных средств. Носитель состоял из 0,5% метилцеллюлозы в воде, которая используется для растворения эрлотиниба, и запатентованного препарата, полученного от Roche, который используется для растворения идасанутлина. Массу опухоли оценивали дважды в неделю с помощью секретируемой люциферазы gaussia. По возможности, мышам лечили в течение 25 дней, прекращали лечение и наблюдали за выживаемостью. Лекарственные средства вводились через желудочный зонд. Размеры выборки были выбраны на основе оценок пробных экспериментов и результатов предыдущих литературных источников<sup>12</sup>. Исследователи были осведомлены о распределении групп или оценке результатов. Все исследования проводились в соответствии с руководящими принципами протокола UCLA OARO.

Внутричерепная отложенная ПЭТ/КТ-визуализация мышей.

Мышам вводили указанную дозу эрлотиниба в указанное время, затем предварительно нагрели, обезболивали 2% изофлураном и внутривенно вводили 70 мкКи <sup>18</sup>F-FDG. После 1 ч бессознательного поглощения мышам выводили из анестезии, но держали в тепле еще 5 ч. Через 6 ч после первоначального введения <sup>18</sup>F-FDG мышам визуализировали с помощью ПЭТ/КТ-сканера G8 (Sofie Biosciences). Как указано выше, количественная оценка была выполнена путем рисования трехмерных представляющих интерес областей (ROI) с использованием программного обеспечения AMIDE.

#### Иммуногистохимия.

Иммуногистохимию проводили на срезах 4 мкм, которые были вырезаны из блоков FFPE (фиксированные формалином, залитые парафином). Затем срезы депарафинировали ксилолом и регидратировали с помощью градуированного этанола. Извлечение антигена было достигнуто с помощью устройства Nuclear Decloaker с pH 9,5 (Biocare Medical) в автоклаве Decloaking при 95°C в течение 40 мин. Затем срезы тканей обрабатывали 3% перекисью водорода (LOT 161509; Fisher Chemical) и Background Sniper (Biocare Medical, Конкорд, Калифорния, США) для уменьшения неспецифического фонового окрашивания. Первичные антитела к p53 (Cell Signaling, 2527) применяли в разведении 1:150 в течение 80 мин с последующим обнаружением с помощью набора для обнаружения MACH 3 Rabbit HRP-Polymer (Biocare Medical). Визуализация была достигнута с использованием VECTOR NovaRED (SK-4800; Vector Laboratories, Inc.) в качестве хромогена. Наконец, срезы были контрастно окрашены автоматическим гематоксилином Tacha (Biocare Medical).

#### Количественная ОТ-ПЦР.

РНК экстрагировали из всех клеток с помощью набора РНК Purelink (Invitrogen). кДНК синтезировали с помощью набора для синтеза кДНК iScript (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Количественная ПЦР (qPCR) была проведена на Roche LightCycler 480 с использованием SYBRGreen Master Mix (Кара Biosciences). Значения относительной экспрессии нормализованы для контрольного гена (GAPDH). Последовательности праймеров, которые перечислены (в направлении от 5' к 3'): P21 (прямая GACTTTGTCACCGAGACACC, обратная GACAGGTCCACATGGTCTTC), PUMA (прямая ACGACCTCAACGCACAGTACG, обратная GTAAGGGCAGGAGTCCCATGATG), GAPDH (прямая TGCCATGTAGACCCCTTGAAG, обратная ATGGTACATGACAAGGTGCGG), MDM2 (прямая CTGTGTTCAAGTGGCGATTGG, обратная AGGGTCTCTTGTTCGGAAGC), Tigar (прямая GGAA-GAGTGCCTGTGTTTAC, обратная GACTCAAGACTTCGGGAAAGG), PIG3 (прямая GCAGCTGCTGGATTCAATTA, обратная TCCCAGTAGGATCCGCCTAT).

#### Репортерная активность P53.

Сначала клетки инфицировали лентивирусом, синтезированным из репортерной плазмиды p53, которая кодирует люциферазу под контролем чувствительного к p53 элемента: TACAGAACATGTCTAAG-CATGCTGTGCCTTGCCTGGACTTGCCTGGCCTTGCCTTGGG. Затем инфицированные клетки помещали в 96-луночный планшет при концентрации 5000 клеток/50 мкл и обрабатывали указанными лекарственными средствами в течение 24 ч, а затем инкубировали с 1 мМ D-люциферинном в течение 2 ч. Биолюминесценцию измеряли с помощью IVIS Lumina II (Perkin Elmer).

#### Генетическая манипуляция.

Обычно лентивирус, используемый для генетических манипуляций, получали путем трансфекции клеток 293-FT (Thermo) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Вирус собирали через 48 ч после трансфекции. Лентивирусный вектор sgp53 и контрольный вектор sg содержали следующие направляющие РНК соответственно: CCGGTTTCATGCCGCCCATGC и GTAATCCTAGCACTTTTAGG. В качестве основы использовался LentiCRISPR-v2. КДНК Glut1 и Glut3 клонировали из коммерчески доступных векторов и включали в лентивирусный остов pLenti-GLuc-IRES-EGFP, содержащий промотор CMV (Glut1 был подарен Wolf Frommer (Addgene #18085<sup>44</sup>), Glut3 был получен от OriGene #SC115791, а лентивирусный остов был получен от Targeting Systems #GL-GFP). pMIG Bcl-xL был подарен Stanley Korsmeyer (Addgene #8790<sup>45</sup>) и клонирован в лентивирусный остов, упомянутый выше (Targeting Systems). Цитоплазматические (K305A и R306A) конструкции p53 дикого типа были любезным подарком от R. Agami и G. Lahav. Представляющие интерес гены клонировали в лентивирусный вектор, содержащий промотор PGK. Конструкции для мутантов ДНК-связывающего домена p53 (R175H) и (R273H), а также ядерного мутанта (L348A и L350A) были созданы с использованием сайт-направленного мутагеназа (New England Biolabs #E0554S) на конструкции p53 дикого типа.

Для экспериментов по нокдауну EGFR миРНК против EGFR (Thermo Fischer Scientific, s563) трансфицировали в клетки с использованием DharmaFECT 4 (Dharmacon). Через 48 ч клетки собирали и использовали для указанных экспериментов.

#### Иммунофлуоресценция.

Для иммунофлуоресценции глиомасферы сначала диссоциировали с одиночными клетками и прикрепляли к 96-луночным планшетам с использованием Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Затем прикрепленные клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 10 мин, затем трижды промывали PBS. Затем клетки инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 10% FBS и 3% BSA в PBS, в течение 1 ч, а затем инкубировали с антителом p53 (Santa Cruz, SC-126, разведение 1:50) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки инкубировали с вторичным антителом (Alexa Fluor 647, разведение 1:2000) в течение 1 ч и окрашиванием DAPI в течение 10 мин, затем визуализировали с помощью микроскопа Nikon TI Eclipse, оснащенного флуоресцентной камерой Cascade II (Roper Scientific). Клетки были визуализированы с излучениями при 461 и 647 нМ, а затем обработаны с использованием программного обеспечения для анализа NIS-Elements AR.

Измерения скорости потребления кислорода (OCR) и скорости внеклеточного закисления (ECAR).

Для метаболических измерений с использованием OCR и ECAR глиомасферы, обработанные ука-

занными лекарственными средствами, сначала диссоциировали с суспензиями отдельных клеток и прикрепляли к планшетам XF24 (Seahorse Bioscience) с помощью Cell-Tak (Corning) в соответствии с инструкциями производителя. Перед анализом в клетки добавляли небуферную среду DMEM и инкубировали при 37°C в течение 30 мин перед началом измерений OCR и ECAR. Показаны основные измерения ECAR между клетками, обработанными контролем, и клетками, обработанными эрлотинибом.

Подготовка образцов для масс-спектропии.

Самцам мышей CD-1 (возраст 6-8 недель) вводили 50 мг/кг идасанутлина в двух экземплярах через пероральный зонд. Через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после введения мышей умерщвляли, собирали кровь путем ретроорбитального обескровливания и собирали ткань мозга. Цельную кровь мышей центрифугировали для выделения плазмы крови. Идасанутлин выделяли методом жидкостной экстракции из плазмы крови: 50 мкл плазмы крови добавляли к 2 мкл внутреннего стандарта и 100 мкл ацетонитрила. Ткань мозга мыши промывали 2 мл холодного PBS и гомогенизировали с использованием гомогенизатора тканей с 2 мл только что полученного холодного PBS. Затем идасанутлин выделяли и восстанавливали аналогичным образом путем жидкостной экстракции: 100 мкл гомогената головного мозга добавляли к 2 мкл внутреннего стандарта и 200 мкл ацетонитрила. После перемешивания на вортексе образцы центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли и выпаривали на ротационном испарителе и восстанавливали в 100 мкл 50:50 вода:ацетонитрил.

Обнаружение идасанутлина с помощью масс-спектрометрии.

Хроматографические разделения выполняли на колонке Phenomenex Kinetex C18 размером 100×2,1 мм (Kinetex) с использованием системы 1290 Infinity LC (Agilent). Подвижная фаза состояла из растворителя А: 0,1% муравьиной кислоты в воде Milli-Q и В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Анализируемые вещества элюировали градиентом 5% В (0-4 мин), 5-99% В (4-32 мин), 99% В (32-36 мин), а затем возвращали к 5% В в течение 12 мин до восстановления равновесия между инъекциями. В хроматографическую систему вводили 20 мкл при скорости потока растворителя 0,10 мл/мин. Масс-спектрометрию проводили на трехкврупольной системе ЖХ/МС 6460 (Agilent). Ионизация была достигнута с помощью электрораспыления в положительном режиме, а сбор данных производился в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). MRM переход, используемый для обнаружения идасанутлина, был  $m/z$  616,2→421,2 с напряжением фрагментатора 114 В и энергией столкновения 20 эВ. Сигнал анализируемого вещества нормализовали по внутреннему стандарту, и концентрации определяли путем сравнения с калибровочной кривой (0,5, 5, 50, 250, 500, 2000 нМ). Концентрации идасанутлина в головном мозге были скорректированы на 1,4% веса мозга мыши для остатка крови в сосудистой сети головного мозга.

Измерения секретируемой люциферазы *gaussia*.

Клетки инфицировали лентивирусным вектором, содержащим репортерный ген секретируемой люциферазы *gaussia* (sGluc) (Targeting Systems #GL-GFP), и интракраниально имплантировали в правое полусчатое тело мышей ( $4 \times 10^5$  клеток/мышь). Для измерения уровней секретируемой люциферазы *Gaussia* (sGluc) из хвостовой вены мышей собирали 6 мкл крови и сразу же смешивали с 50 мМ ЭДТА для предотвращения коагуляции. Активность Gluc определяли путем измерения хемилюминесценции после инъекции 100 мкл 100 мкМ целентеразина (Nanolight) в 96-луночный планшет.

Расчет баллов синергизма.

$1,0 \times 10^5$  клеток GBM высевали в трех экземплярах и обрабатывали эрлотинибом, нутлином или комбинацией в нескольких концентрациях с использованием матрицы, где каждое лекарственное средство добавляли к клеткам в шести концентрациях (0-10 мкМ). Окрашивание аннексином V измеряли через 72 ч после обработки. Используя программное обеспечение Chalice, реакцию комбинации сравнивали с ее отдельными агентами. Комбинаторные эффекты рассчитывались с использованием балла синергизма.

Секвенирование ДНК.

Нацеленное секвенирование было выполнено для образцов НК206, НК217, НК250, НК296 для следующих генов BCL11A, BCL11B, BRAF, CDKN2A, CHEK2, EGFR, ERBB2, IDH1, IDH2, MSH6, NF1, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, TP53 с использованием Illumina Miseq. Было от 1 до 2 млн считываний на образец со средним охватом 230 на ген. Для этих образцов были определены варианты числа копий с использованием массива SNP для всего генома. Генетический профиль GBM39 ранее описывался в литературе.

Полное секвенирование экзома было выполнено для образцов НК157, НК229, НК248, НК250, НК254, НК296, НК301, НК336, НК350, НК390, НК393 и выполнено в SeqWright. Образцы были сгруппированы в 2 группы с отдельными реакциями захвата. Использовали быстрый захват Nextera и подготовку библиотеки, а секвенирование выполняли на HiSeq 2500,  $2 \times 100$  п.о. со 100-кратным охватом мишени, 2 полными быстрыми прогонами, каждый с 1 нормальным диплоидным контролем. Анализ числа копий для этих образцов проводили с использованием программного обеспечения EXCAVATOR.

Примечание образцов TCGA.

273 Образца GBM из TCGA были проанализированы на генетические изменения в путях, регулируемых EGFR, p53 и p53. Была изучена совместная встречаемость мутаций и отображены только значимые взаимодействия. Данные были проанализированы с помощью sBioPortal, как описано ранее.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) выполняли с использованием коммерчески доступного флуоресцентно меченного двухцветного зонда EGFR (красный)/CEP 7 (зеленый) (Abbott-Molecular). Гибридизацию и анализ FISH проводили на клеточных линиях в соответствии с протоколами, предложенными производителем. Клетки докрашивали с помощью DAPI, и сигналы флуоресцентного зонда визуализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss (Axiophot), оборудованным двухцветными и трехцветными фильтрами.

Статистический анализ.

Сравнения проводились с использованием двусторонних непарных *t*-критериев Стьюдента, и значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми. Предполагалось, что все данные из нескольких независимых экспериментов имеют нормальную дисперсию. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  значения стандартной ошибки среднего. Все статистические анализы были рассчитаны с использованием Prism 6.0 (GraphPad). Для всех экспериментов *in vitro* и *in vivo* не использовался статистический метод для предварительного определения размера образца, и образцы не были исключены. Для измерений опухолей *in vivo* последние наборы данных использовались для сравнения между группами. Как описано выше, все мыши были рандомизированы перед исследованиями.

Пример 15. Иллюстративные принципы разработки для определенных соединений серии JFK.

Определенные соединения по настоящему изобретению были разработаны в соответствии со схемой 1.

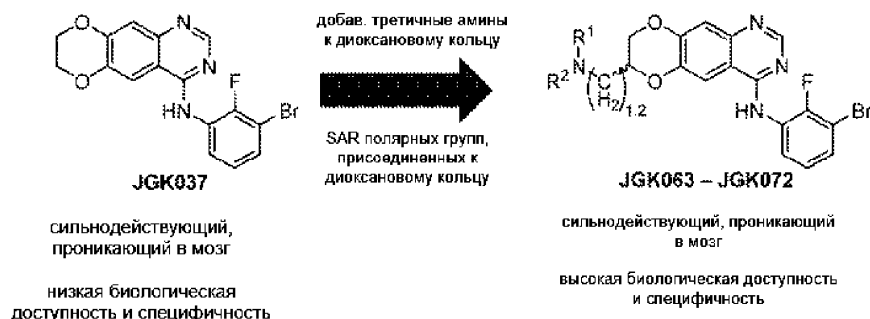


Схема 1

Пример 16. Получение дополнительных иллюстративных соединений серии JGK.

Иллюстративные соединения по настоящему изобретению были получены в соответствии со следующими способами.

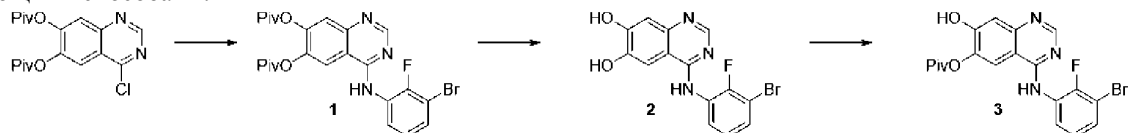


Схема 1. Синтез монозамещенного промежуточного соединения хиназолина 3

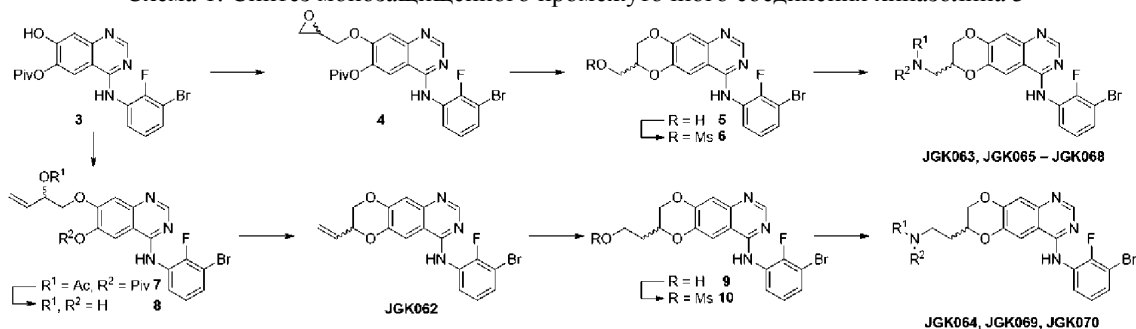


Схема 2. Синтез JGK063 - JGK070

Синтез выполняли аналогичным образом, как для рацемического образца JGK068 ((±)-JGK068), но с энантиомерно чистым (S)-(-)-глицидом. Другой энантиомер JGK068R ((R)-JGK068) получали с использованием (R)-(+)-глицидола (не показан).

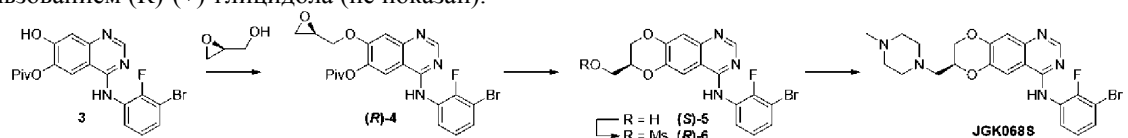


Схема 3. Синтез JGK068S ((S)-JGK068)

Энантиомерную чистоту синтетического промежуточного соединения 5 определяли с помощью хиральной СФХ (колонка Chiralpak AD-3, 40% MeOH) и путем сравнения спектров  $^{19}\text{F}$  ЯМР производных

эфира Мошера 5 (фиг. 39).

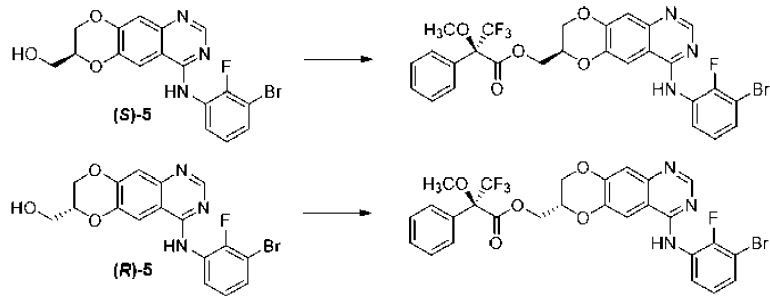


Схема 4

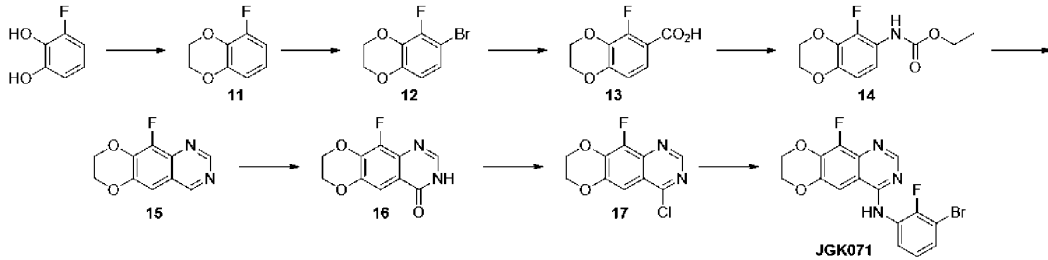


Схема 5. Синтез JGK071

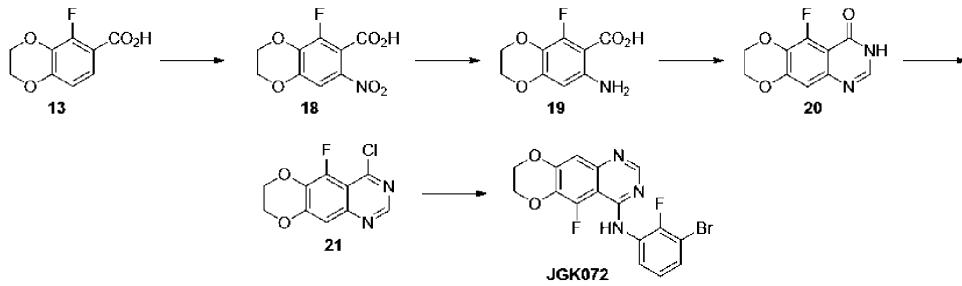


Схема 6. Синтез JGK072

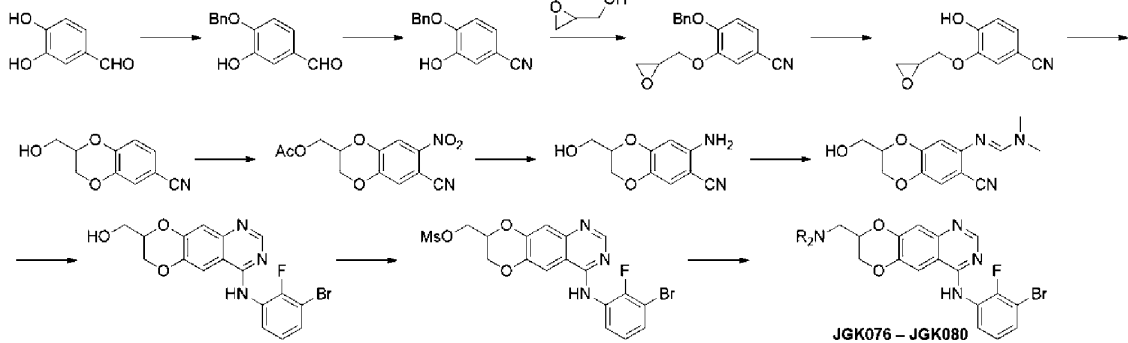


Схема 7. Синтез JGK076-JGK080

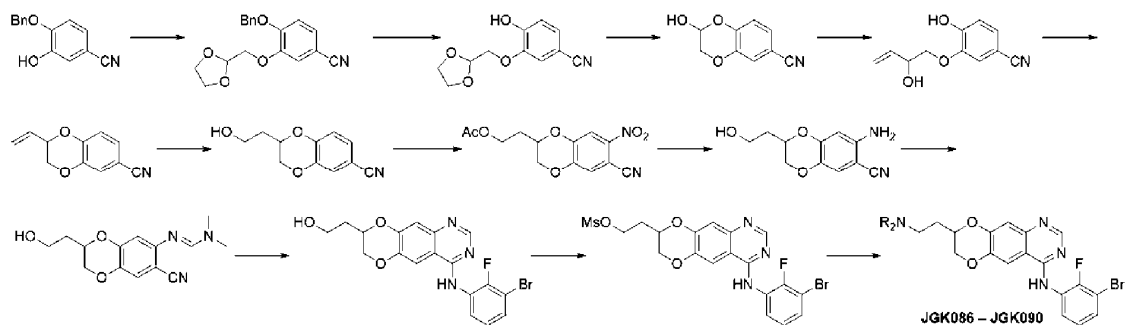


Схема 8. Синтез JGK086-JGK090

Общая химическая информация.

Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Ре-

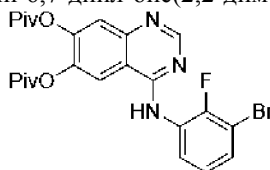


акции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора SEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°C). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F<sub>254</sub> с пятнами, визуализированными УФ-светом ( $\lambda=254, 365$  нм) или с использованием щелочного раствора KMnO<sub>4</sub>. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO<sub>2</sub> 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Препаративную тонкослойную хроматографию (ПТСХ) проводили с пластинами силикагеля Merck 60 F<sub>254</sub> (20×20 см, 210-270 мм) или пластинами для ТСХ Analtech Silica Gel GF (20×20 см, 1000 мм). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 23-50°C. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (<sup>13</sup>C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР ( $\delta$  ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные <sup>1</sup>H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, quint=квинтет, m=мультиплет/смешанный тип, td=триплет дублетов, ddd=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (J) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР <sup>13</sup>C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействий. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопротоотборником.

Общие процедуры (GP). GP-1. Нуклеофильное замещение хиразолинилмезилатов вторичными аминами. Смесь хиразолинилмезилата (1 экв.) в DMF (0,05 м) обрабатывали с помощью вторичного амина (5 экв.) и триэтиламина (2 экв.) и смесь перемешивали при 85°C в течение 24 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток растворяли в EtOAc (20 мл), промывали с помощью 10 мм NaOH (4×5 мл), соевым раствором (5 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ФХ или ПТСХ обеспечивала получение необходимых продуктов обычно в виде грязно-белых рыхлых пен.

GP-2. Нуклеофильное ароматическое замещение 4-хлорхиразолина анилинами. Смесь 4-хлорхиразолина (1 экв.) в ацетонитриле (0,1 м) обрабатывали с помощью анилина (2 экв.) и 4 М раствора HCl в диоксане (1 экв.). Смесь нагревали при 80°C в условиях микроволнового излучения в течение 30 мин. Смесь концентрировали при пониженном давлении или осажденную соль 4-анилинохиразолина гидрохлорида выделяли фильтрацией (промывки с помощью Et<sub>2</sub>O). Остаток суспендировали в насыщ. водн. растворе NaHCO<sub>3</sub> и экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×). Объединенные органические экстракты промывали водой, соевым раствором, сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и концентрировали. Очистка посредством ФХ (элюирование градиентом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc или гексаны/EtOAc) обеспечивала получение необходимых продуктов, обычно в виде от белого до грязно-белого или бледно-желтого твердых веществ.

4-(3-Бром-2-фторанилино)хиразолин-6,7-диил-бис(2,2-диметилпропаноат) (1).



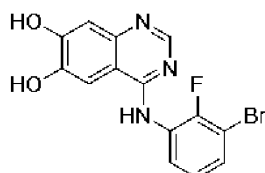
Смесь 4-хлорхиразолин-6,7-диил-бис(2,2-диметилпропаноат)<sup>1</sup> (41,08 г, 113 ммоль) в iPrOH (450 мл) обрабатывали с помощью 3-бром-2-фторанилина (17,05 мл, 152 ммоль) и перемешивали при 80°C в течение 3,5 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток несколько раз суспендировали в гексанах (50 мл) и концентрировали и затем высушивали под высоким вакуумом. Остаток повторно кристаллизовали из EtOH с получением желтого твердого вещества, которое суспендировали в насыщ. водн. растворе NaHCO<sub>3</sub> (1 л) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×550 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), соевым раствором (400 мл), сушили (MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 1 (35,057 г, 60%) в виде желтой рыхлой пены.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,76 (с, 1H), 8,46 (т, J=7,5 Гц, 1H), 7,72 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,56 (уш, 1H), 7,32 (дд, J=8,0, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 1,40 (с, 9H), 1,39 м.д. (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176,13, 175,55, 156,71, 154,96, 150,69 (д, J<sub>CF</sub>=243,7 Гц), 148,75, 147,83, 142,45, 128,27, 127,86 (д, J<sub>CF</sub>=10,8 Гц), 125,29 (д, J<sub>CF</sub>=4,7 Гц), 122,70, 122,51, 114,43, 113,21, 108,84 (д, J<sub>CF</sub>=19,4 Гц), 39,54, 39,51, 27,40, 27,32 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, 518,1085; обнаружено 518,1072.

4-(3-Бром-2-фторанилино)хиразолин-6,7-диол (2).



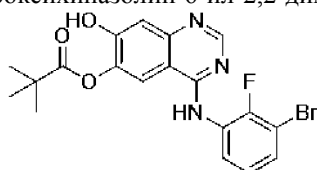
Перемешиваемую взвесь 1 (34,988 г, 67,5 ммоль) обрабатывали при 0°C с помощью 7 М раствора NH<sub>3</sub> в MeOH (241 мл, 1,69 моль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин и затем при 23°C в течение 4,5 ч. Смесь выпаривали и остаток суспендировали в воде (400 мл), перемешивали в течение ночи и фильтровали. Остаток промывали водой (500 мл), ацетонитрилом (100 мл), ДХМ (4×150 мл), Et<sub>2</sub>O (2×150 мл) и сушили в осушителе с получением указанного в заголовке соединения 2 (23,68 г, колич.) в виде бледно-желтого порошка.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,18 (с, 1H), 7,59-7,47 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,16 (т, J=8,0 Гц, 1H), 6,87 м.д. (с, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 156,43, 156,12, 153,06 (д, J<sub>CF</sub>=246,7 Гц), 151,34, 148,39, 146,80, 129,23, 129,01, 127,12, 125,23 (д, J<sub>CF</sub>=4,3 Гц), 108,47, 108,32, 107,09, 103,04 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 349,9935; обнаружено 349,9923.

4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-гидроксихиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат (3).



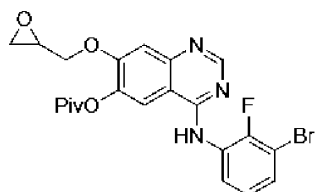
Перемешиваемая суспензия 2 (3500 мг, 10,0 ммоль) в DMF (52,6 мл) обрабатывали с помощью Et<sub>3</sub>N (5,57 мл, 40,0 ммоль), охлаждали до -40°C и по каплям обрабатывали с помощью Piv<sub>2</sub>O (3,14 мл, 15,5 ммоль). Смесь перемешивали при -40°C в течение 1 ч, после чего охлаждающую баню удаляли и перемешивание продолжали в течение 2,5 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью ДХМ (500 мл), промывали 10% уксусной кислотой (2×50 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:1→0:1) обеспечивала получение твердого вещества, которое повторно растворяли в EtOAc (750 мл) и промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора NH<sub>4</sub>Cl (4×75 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 3 (2,844 г, 66%) в виде бежево-желтого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,00 (уш, 1H), 9,70 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,3, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 1,36 м.д. (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 175,93, 157,68, 154,61, 154,53, 153,34 (д, J<sub>CF</sub>=247,3 Гц), 149,80, 139,65, 130,14, 127,92 (д, J<sub>CF</sub>=12,9 Гц), 127,62, 125,47 (д, J<sub>CF</sub>=4,4 Гц), 116,36, 111,00, 108,55 (д, J=20,0 Гц), 107,77, 38,64, 26,93 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 434,0510; обнаружено 434,0489.

(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-[(оксиран-2-ил)метокси]хиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат ((±)-4).



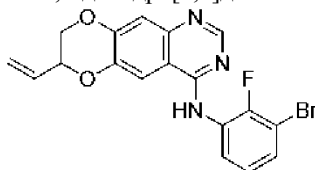
Смесь 3 (1350 мг, 3,11 ммоль) и PPh<sub>3</sub> (2038 мг, 7,77 ммоль) в ТГФ (21 мл) обрабатывали с помощью глицидола (495 мкл, 7,46 ммоль), охлаждали до 0°C и обрабатывали с помощью DIAD (1,47 мл, 7,46 ммоль) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при 23°C в течение 2,5 ч и концентрировали. ФХ (ДХМ/EtOAc 9:1→4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-4 (848 мг, 56%) в виде грязно-белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,73 (с, 1H), 8,54 (ддд, J=8,6, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,45 (уш, 1H), 7,30 (ддд, J=8,2, 6,4, 1,5 Гц, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,34 (дд, J=10,8, 3,0 Гц, 1H), 3,99 (дд, J=10,8, 6,2 Гц, 1H), 3,35 (ддт, J=6,2, 4,1, 2,8 Гц, 1H), 2,92 (дд, J=4,8, 4,1 Гц, 1H), 2,74 (дд, J=4,8, 2,6 Гц, 1H), 1,45 м.д. (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,87, 156,46, 155,10, 154,93, 150,41 (д, J<sub>CF</sub>=243,3 Гц), 150,27, 140,99, 128,25 (д, J<sub>CF</sub>=10,5 Гц), 127,75, 125,28 (д, J<sub>CF</sub>=4,7 Гц), 122,22, 114,02, 109,72, 109,49, 108,74 (д, J<sub>CF</sub>=19,1 Гц), 70,05, 49,55, 44,56, 39,45, 27,38 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, 490,0772; обнаружено 490,0764.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-этинил-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-JGK062).



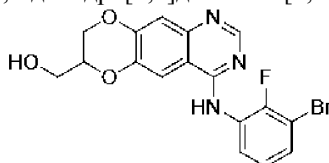
Раствор  $\text{PPh}_3$  (832 мг, 3,17 ммоль) и DIAD (624 мкл, 3,17 ммоль) в ТГФ (23 мл) перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 15 мин, и затем по каплям добавляли в раствор (±)-8 (1149 мг, 2,73 ммоль) в ТГФ (27 мл) в течение 10 мин. при  $0^\circ\text{C}$ . Смесь перемешивали при  $0^\circ$  в течение 2 ч и выпаривали. ФХ (гексаны/ $\text{EtOAc}$  9:1→4:6) с последующей другой ФХ ( $\text{ДХМ}/\text{EtOAc}$  1:0→6:4) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-JGK062 (1115 мг, колич.) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд,  $J=8,2, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,0, 6,4, 1,5$  Гц, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 5,95 (ддд,  $J=17,3, 10,7, 5,8$  Гц, 1H), 5,60 (дт,  $J=17,3, 1,2$  Гц, 1H), 5,48 (дт,  $J=10,7, 1,1$  Гц, 1H), 4,82-4,74 (м, 1H), 4,42 (дд,  $J=11,5, 2,5$  Гц, 1H), 4,09 м.д. (дд,  $J=11,6, 8,1$  Гц, 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,90, 153,38, 150,14 (д,  $J=242,4$  Гц), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (д,  $J=10,3$  Гц), 127,24, 125,30 (д,  $J=4,7$  Гц), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (д,  $J=19,3$  Гц), 106,06, 74,03, 67,84 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$ , 402,0248; обнаружено 402,0233.

(±)-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метанол ((±)-5).



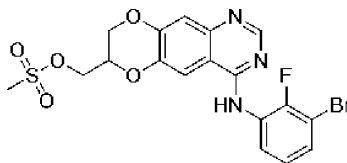
Смесь (±)-4 (842 мг, 1,72 ммоль) в  $\text{MeOH}$  (31 мл) обрабатывали с помощью  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (482 мг, 3,49 ммоль), перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 10,5 ч и концентрировали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (130 мл) и экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $3 \times 20$  мл). Объединенные органические вещества промывали водой (20 мл), соевым раствором (20 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (±)-5 (720 мг, колич.) в виде желтого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,59 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,2, 1,6$  Гц, 1H), 7,55 (ддд,  $J=8,4, 7,0, 1,6$  Гц, 1H), 7,24-7,18 (м, 1H), 7,21 (с, 1H), 5,16 (т,  $J=5,6$  Гц, 1H), 4,49 (дд,  $J=11,5, 2,4$  Гц, 1H), 4,34 (дтд,  $J=7,6, 5,2, 2,3$  Гц, 1H), 4,21 (дд,  $J=11,5, 7,4$  Гц, 1H), 3,76-3,64 м.д. (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  157,20, 153,35 (д,  $J_{\text{CF}}=247,5$  Гц), 153,10, 148,88, 145,95, 143,39, 130,11, 128,05 (д,  $J_{\text{CF}}=13,0$  Гц), 127,73, 125,44 (д,  $J_{\text{CF}}=4,4$  Гц), 112,33, 109,79, 108,56 (д,  $J_{\text{CF}}=20,0$  Гц), 108,37, 73,78, 65,50, 59,78 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$ , 406,0197; обнаружено 406,0185.

(±)-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метилметансульфонат ((±)-6).



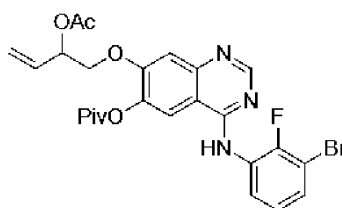
Раствор (±)-5 (688 мг, 1,69 ммоль) в ТГФ (14 мл) обрабатывали с помощью  $\text{Et}_3\text{N}$  (357 мкл, 2,56 ммоль), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и по каплям обрабатывали с помощью  $\text{MsCl}$  (174 мкл, 2,24 ммоль). Смесь перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 16 ч, охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , обрабатывали насыщ. водн. раствором  $\text{NaHCO}_3$  (120 мл) и экстрагировали с помощью  $\text{ДХМ}$  ( $3 \times 120$  мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), соевым раствором (100 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ ( $\text{ДХМ}/\text{EtOAc}$  8:2→3:7) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-6 (496 мг, 61%) в виде грязно-белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,69 (с, 1H), 8,60 (ддд,  $J=8,5, 7,2, 1,4$  Гц, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,37 (с, 1H), 7,29 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,5$  Гц, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,63 (дтд,  $J=7,2, 4,9, 2,5$  Гц, 1H), 4,52 (дд,  $J=4,9, 0,9$  Гц, 2H), 4,49 (дд,  $J=11,8, 2,5$  Гц, 1H), 4,29 (дд,  $J=11,8, 7,1$  Гц, 1H), 3,13 м.д. (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,02, 153,66, 150,28 (д,  $J_{\text{CF}}=242,9$  Гц), 148,65, 146,80, 143,09, 128,43 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,54, 125,32 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 122,01, 114,77, 110,90, 108,66 (д,  $J_{\text{CF}}=19,4$  Гц), 106,44, 71,10, 66,46, 64,77, 38,02 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrFN}_3\text{O}_5\text{S}^+$ , 483,9973; обнаружено 483,9950.

(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-{{2-(ацетокси)бут-3-ен-1-ил}окси}хиназолин-6-ил-2,2-диметилпропаноат ((±)-7).



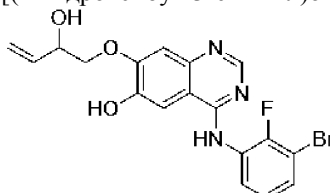
Смесь 3 (2639 мг, 6,08 ммоль) и  $\text{PPh}_3$  (3986 мг, 15,2 ммоль) в ТГФ (41 мл) обрабатывали с помощью рацемического 1-гидроксибут-3-ен-2-илацетата<sup>2</sup> (1,7 мл, 13,7 ммоль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью DIAD (2,7 мл, 13,7 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 3 ч и концентрировали. ФХ (ДХМ/ЕтОАс 1:0→6:4) обеспечивала получение неочищенного (±)-7 (5,508 г, оцененный выход 60%) в виде грязно-белого твердого вещества, которое загрязняли остатком  $\text{Rh}_3\text{PO}$ . Материал использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,74 (с, 1H), 8,53 (т, J=7,9 Гц, 1H), 7,53 (с, 1H), 7,45 (уш, 1H), 7,33 (с, 1H), 7,30 (т, J=7,7 Гц, 1H), 7,11 (т, J=8,0 Гц, 1H), 5,90 (ддд, J=17,0, 10,6, 6,2 Гц, 1H), 5,65 (q, J=6,0 Гц, 1H), 5,49-5,29 (м, 2H), 4,31-4,08 (м, 2H), 2,11 (с, 3H), 1,41 м.д. (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,51, 170,08, 156,49, 155,24, 154,88, 150,46 (д,  $J_{\text{CF}}=243,2$  Гц), 150,17, 140,90, 132,16, 128,18 (д,  $J_{\text{CF}}=11,0$  Гц), 127,86, 125,31 (д,  $J_{\text{CF}}=4,8$  Гц), 122,27, 119,64, 114,00, 109,56, 109,39, 108,76 (д,  $J_{\text{CF}}=19,4$  Гц), 72,18, 69,81, 39,34, 27,33, 21,19 м.д.;

МСВР (DART): m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrFN}_3\text{O}_5^+$ , 546,1034; обнаружено 546,1018.

(±)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7-[(2-гидроксибут-3-ен-1-ил)окси]хиназолин-6-ол.



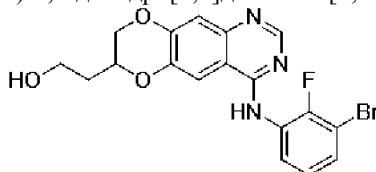
Смесь неочищенного (±)-7 (5508 мг, загрязненного остатком  $\text{Rh}_3\text{PO}$  с последней стадии) в MeOH (61 мл) обрабатывали с помощью  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4198 мг, 30,4 ммоль), перемешивали при 23°C в течение 1 ч и концентрировали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×600 мл). Объединенные органические вещества сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/ЕтОАс 1:1→0:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (±)-8 (1154 мг, 45% с двух стадий) в виде грязно-белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,46 (с, 1H), 9,40 (уш, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,71 (с, 1H), 7,59-7,52 (м, 2H), 7,203 (с), 7,197 (тд, J=8,1, 1,1 Гц, 1H), 6,01 (ддд, J=17,4, 10,7, 4,9 Гц, 1H), 5,42 (дт, J=17,3, 1,9 Гц, 1H), 5,36 (уш, 1H), 5,20 (дт, J=10,6, 1,8 Гц, 1H), 4,49 (уш, 1H), 4,20 (дд, J=9,8, 3,8 Гц, 1H), 3,95 м.д. (дд, J=9,8, 7,5 Гц, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  156,77, 153,30 (д,  $J_{\text{CF}}=244,9$  Гц), 152,77, 152,31, 146,66, 146,11, 137,61, 129,75, 128,46 (д,  $J_{\text{CF}}=13,0$  Гц), 127,49, 125,38 (д,  $J_{\text{CF}}=4,3$  Гц), 115,58, 109,42, 108,50 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 107,68, 105,14, 72,56, 69,26 м.д.;

МСВР (DART): m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$ , 420,0354; обнаружено 420,0340.

(±)-2-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]этан-1-ол ((±)-9).



Смесь (±)-JGK062 (480 мг, 1,19 ммоль) в ТГФ (4,8 мл) обрабатывали с помощью 0,5 М раствора 9-BBN в ТГФ (4,8 мл, 2,39 ммоль) и смесь перемешивали при 68°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до 0°C, разбавляли с помощью ТГФ (2,4 мл) и обрабатывали с помощью 3 н. NaOH (3 мл, 8,95 ммоль) и 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (474 мкл, 8,95 ммоль) и перемешивали при 23°C в течение 6 ч. Смесь концентрировали до около половины исходного объема ТГФ, разбавляли водой (100 мл) и соевым раствором (40 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (70 мл), соевым раствором (70 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (±)-9 (912 мг) в виде желтой пены, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

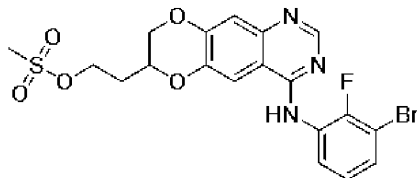
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,66 (с, 1H), 8,62 (ддд, J=8,8, 7,4, 1,6 Гц, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,33 (уш, 1H), 7,2 (ддд, J=8,0, 6,5, 1,6 Гц, 1H), 7,16 (с, 1H), 7,09 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,50 (дтд, J=8,4, 6,4, 2,3 Гц, 1H), 4,43

(дд,  $J=11,5, 2,3$  Гц, 1H), 4,09 (дд,  $J=11,5, 8,2$  Гц, 1H), 4,01-3,91 (м, 2H), 1,95 м.д. (тд,  $J=6,5, 5,3$  Гц, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,84, 153,28, 150,08 (д,  $J_{\text{CF}}=242,6$  Гц), 149,42, 146,47, 144,20, 128,51 (д,  $J_{\text{CF}}=10,2$  Гц), 127,31, 125,30 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 121,69, 113,95, 110,50, 108,58 (д,  $J_{\text{CF}}=19,2$  Гц), 105,83, 71,33, 68,49, 58,23, 33,61 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$ , 420,0354; обнаружено 420,0370.

( $\pm$ )-2-[4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-7-ил]этилметансульфонат (( $\pm$ )-10).



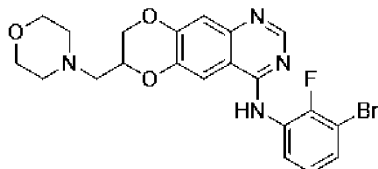
Раствор неочищенного ( $\pm$ )-9 (912 мг) в ТГФ (11,9 мл) обрабатывали с помощью  $\text{Et}_3\text{N}$  (931 мл, 6,68 ммоль), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и по каплям обрабатывали с помощью  $\text{MsCl}$  (462 мкл, 5,97 ммоль). Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 15 мин и затем при  $23^\circ\text{C}$  в течение 21 ч. Смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , по каплям обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора  $\text{NaHCO}_3$  (120 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3 $\times$ 120 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), соевым раствором (100 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ (ДХМ/ $\text{EtOAc}$  9:1 $\rightarrow$ 4:6) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения ( $\pm$ )-10 (112 мг, 19% с двух стадий) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,60 (ддд,  $J=8,6, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,44 (уш, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,29 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,6$  Гц, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,60-4,48 (м, 3H), 4,44 (дд,  $J=11,6, 2,4$  Гц, 1H), 4,12 (дд,  $J=11,6, 7,6$  Гц, 1H), 3,08 (с, 3H), 2,24-2,10 м.д. (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,03, 153,39, 150,31 (д,  $J_{\text{CF}}=242,9$  Гц), 149,11, 146,54, 143,60, 128,47 (д,  $J_{\text{CF}}=10,5$  Гц), 127,52, 125,32 (д,  $J_{\text{CF}}=4,6$  Гц), 122,02, 114,30, 110,68, 108,66 (д,  $J_{\text{CF}}=19,2$  Гц), 106,32, 69,78, 67,82, 65,05, 37,75, 30,90 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{BrFN}_3\text{O}_5\text{S}^+$ , 498,0129; обнаружено 498,0144.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(морфолин-4-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK063).



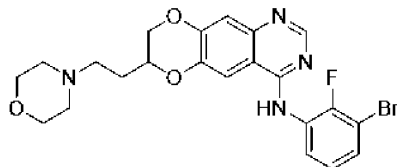
После общей процедуры GP-1 соединение ( $\pm$ )-JGK063 получали из ( $\pm$ )-6 (20 мг, 0,04 ммоль) и морфолина (18 мкл, 0,21 ммоль) в DMF (826 мкл). ПТСХ (ДХМ/ $\text{EtOAc}$  1:9) обеспечивала получение ( $\pm$ )-JGK063 (15 мг, 76%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд,  $J=8,6, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,31 (с, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,0, 6,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,50-4,41 (м, 2H), 4,21-4,12 (м, 1H), 3,75 (т,  $J=4,7$  Гц, 4H), 2,77 (дд,  $J=13,4, 5,9$  Гц, 1H), 2,69-2,54 м.д. (м, 5H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,89, 153,36, 150,15 (д,  $J_{\text{CF}}=242,5$  Гц), 149,35, 146,66, 144,02, 128,60 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,27, 125,30 (д,  $J_{\text{CF}}=4,6$  Гц), 121,80, 114,29, 110,63, 108,58 (д,  $J_{\text{CF}}=19,5$  Гц), 106,06, 71,61, 67,18, 67,01, 58,94, 54,56 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  расщ. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrFN}_4\text{O}_3^-$ , 473,0630; обнаружено 473,0630.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(морфолин-4-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK064).



После общей процедуры GP-1 соединение ( $\pm$ )-JGK064 получали из ( $\pm$ )-10 (35 мг, 0,07 ммоль) и морфолина (31 мкл, 0,35 ммоль) в DMF (1,4 мл). ПТСХ ( $\text{EtOAc}$ , 0,5% ацетонитрил, 1,5% водн. раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) с последующей другой ПТСХ ( $\text{EtOAc}$ ) обеспечивала получение ( $\pm$ )-JGK064 (25 мг, 73%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

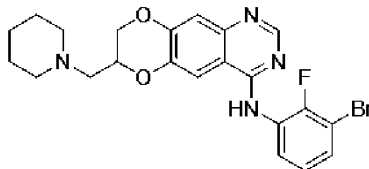
$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд,  $J=8,3, 7,4, 1,5$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,30-7,25 (м, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,44 (дд,  $J=11,3, 2,3$  Гц, 1H), 4,43-4,37 (м, 1H), 4,10 (дд,  $J=11,3, 7,7$  Гц, 1H), 3,73 (т,  $J=4,7$  Гц, 4H), 2,62 (ддт,  $J=12,5, 8,4, 3,9$  Гц, 2H), 2,57-2,42 (м, 4H),

2,00-1,82 м.д. (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,86, 153,31, 150,13 (д,  $J_{\text{CF}}=242,3$  Гц), 149,40, 146,67, 144,33, 128,66 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,22, 125,33 (д,  $J_{\text{CF}}=4,6$  Гц), 121,75, 114,21, 110,63, 108,58 (д,  $J_{\text{CF}}=19,2$  Гц), 105,87, 72,20, 68,33, 67,06, 54,23, 53,86, 28,15 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BrFN}_4\text{O}_3^+$ , 489,0932; обнаружено 489,0935.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пиперидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK065).



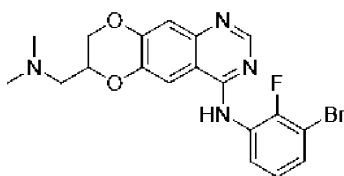
После общей процедуры GP-1 соединение ( $\pm$ )-JGK065 получали из ( $\pm$ )-6 (40 мг, 0,08 ммоль) и пиперидина (41 мкл, 0,41 ммоль) в DMF (1,65 мл). ПТСХ (EtOAc) обеспечивала получение ( $\pm$ )-JGK065 (24 мг, 61%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,66 (с, 1H), 8,63 (ддд,  $J=8,7, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,369 (с, 1H), 7,368 (уш, 1H), 7,30 (с, 1H), 7,26 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,5$  Гц, 1H), 7,09 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,46 (дд,  $J=11,3, 2,3$  Гц, 1H), 4,43 (ддд,  $J=8,3, 5,8, 2,0$  Гц, 1H), 4,12 (дд,  $J=11,2, 7,5$  Гц, 1H), 2,71 (дд,  $J=13,3, 5,9$  Гц, 1H), 2,58 (дд,  $J=13,4, 6,2$  Гц, 1H), 2,59-2,42 (м, 4H), 1,65-1,57 (м, 4H), 1,49-1,41 м.д. (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,86, 153,26, 150,12 (д,  $J_{\text{CF}}=242,6$  Гц), 149,49, 146,62, 144,23, 128,65 (д,  $J_{\text{CF}}=10,3$  Гц), 127,18, 125,27 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 121,76, 114,16, 110,57, 108,56 (д,  $J_{\text{CF}}=19,4$  Гц), 106,00, 71,87, 67,46, 59,34, 55,59, 26,07, 24,20 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$ , 473,0983; обнаружено 473,0991.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(диметиламино)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK066).



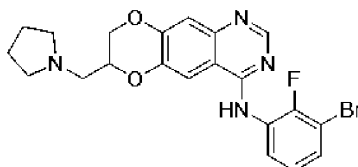
После общей процедуры GP-1 соединение ( $\pm$ )-JGK066 получали из ( $\pm$ )-6 (45 мг, 0,09 ммоль) и 2 М раствора  $\text{Me}_2\text{NH}$  в ТГФ (232 мкл, 0,46 ммоль) в DMF (1,85 мл). ПТСХ (EtOAc, 0,5% ацетонитрил, 1,5% водн. раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) обеспечивала получение ( $\pm$ )-JGK066 (39 мг, 97%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,680 (с, 1H), 8,675 (ддд,  $J=8,2, 7,5, 1,5$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,37 (уш, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,0, 6,4, 1,5$  Гц, 1H), 7,10 (д,  $J=1,6$  Гц, 1H), 4,46-4,41 (м, 1H), 4,45 (дд,  $J=11,8, 2,3$  Гц, 1H), 4,12 (дд,  $J=11,9, 8,1$  Гц, 1H), 2,73 (дд,  $J=13,2, 7,1$  Гц, 1H), 2,55 (дд,  $J=13,1, 5,0$  Гц, 1H), 2,38 м.д. (с, 6H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,89, 153,34, 150,07 (д,  $J_{\text{CF}}=242,3$  Гц), 149,38, 146,67, 144,06, 128,70 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,16, 125,29 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 121,65, 114,27, 110,67, 108,56 (д,  $J_{\text{CF}}=19,4$  Гц), 106,15, 71,70, 67,20, 59,78, 46,41 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$ , 433,0670; обнаружено 433,0677.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пирролидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (( $\pm$ )-JGK067).



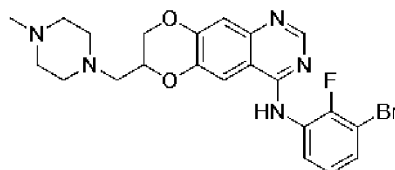
После общей процедуры GP-1 соединение ( $\pm$ )-JGK067 получали из ( $\pm$ )-6 (35 мг, 0,07 ммоль) и пирролидина (30 мкл, 0,36 ммоль) в DMF (1,45 мл). ПТСХ (EtOAc, 1,5% iPrOH, 1,5% водн. раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) обеспечивала получение ( $\pm$ )-JGK067 (31 мг, 93%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,67 (ддд,  $J=8,7, 7,5, 1,6$  Гц, 2H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,0, 6,4, 1,5$  Гц, 2H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,49-4,42 (м, 1H), 4,48 (дд,  $J=11,6, 2,0$  Гц, 1H), 4,15 (дд,  $J=11,7, 8,0$  Гц, 1H), 2,88 (дд,  $J=12,9, 6,5$  Гц, 1H), 2,80 (дд,  $J=12,6, 5,5$  Гц, 1H), 2,72-2,60 (м, 4H), 1,90-1,79 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,87, 153,32, 150,09 (д,  $J_{\text{CF}}=242,6$  Гц), 149,45, 146,68, 144,18, 128,71 (д,  $J_{\text{CF}}=10,3$  Гц), 127,15, 125,30 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 121,67, 114,26, 110,65, 108,56 (д,  $J_{\text{CF}}=19,4$  Гц), 106,06, 72,73, 67,35, 56,57, 55,15, 23,75 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{21}H_{21}BrFN_4O_2^+$ , 459,0826; обнаружено 459,0845.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-JGK068).



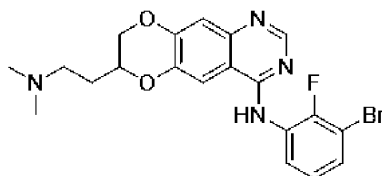
После общей процедуры GP-1 соединение (±)-JGK068 получали из (±)-6 (35 мг, 0,07 ммоль) и 1-метилпиперазина (40 мкл, 0,36 ммоль) в DMF (1,45 мл). ПТСХ (EtOAc/iPrOH 85:15, 1,5% водн. раствор  $NH_4OH$ ) обеспечивала получение (±)-JGK068 (29 мг, 82%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,64 (ддд,  $J=8,3, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (уш д,  $J=3,8$  Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,0, 6,5, 1,6$  Гц, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,48-4,41 (м, 2H), 4,15 (дд,  $J=11,5, 8,6$  Гц, 1H), 2,78 (дд,  $J=13,4, 6,0$  Гц, 1H), 2,661 (дд,  $J=13,4, 5,8$  Гц, 1H), 2,656 (уш, 4H), 2,51 (уш, 4H), 2,32 м.д. (с, 3H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155,89, 153,35, 150,15 (д,  $J_{CF}=242,6$  Гц), 149,40, 146,69, 144,11, 128,64 (д,  $J_{CF}=10,3$  Гц), 127,24, 125,30 (д,  $J_{CF}=4,7$  Гц), 121,78, 114,27, 110,63, 108,59 (д,  $J_{CF}=19,2$  Гц), 106,07, 71,80, 67,27, 58,43, 55,10, 53,96, 46,06 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{22}H_{24}BrFN_5O_2^+$ , 488,1092; обнаружено 488,1109.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(диметиламино)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-JGK069).



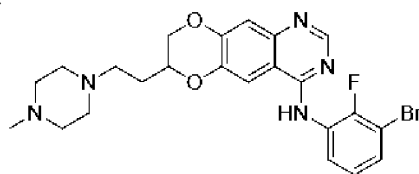
После общей процедуры GP-1 соединение (±)-JGK069 получали из (±)-10 (32 мг, 0,06 ммоль) и 2 M раствора  $Me_2NH$  в ТГФ (161 мкл, 0,32 ммоль) в DMF (1,3 мл). ПТСХ (EtOAc, 5% iPrOH, 1,5% водн. раствор  $NH_4OH$ ) обеспечивала получение (±)-JGK069 (19 мг, 66%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд,  $J=8,7, 7,4, 1,6$  Гц, 1H), 7,373 (уш, 1H), 7,371 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,28-7,24 (м, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,42 (дд,  $J=11,4, 2,3$  Гц, 1H), 4,38 (ттд,  $J=7,7, 5,1, 2,3$  Гц, 1H), 4,08 (дд,  $J=11,3, 7,8$  Гц, 1H), 2,56 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,29 (с, 6H), 1,93 (дк,  $J=14,2, 7,4$  Гц, 1H), 1,84 м.д. (дтд,  $J=14,2, 7,5, 5,1$  Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155,86, 153,26, 150,14 (д,  $J_{CF}=242,4$  Гц), 149,42, 146,65, 144,36, 128,67 (д,  $J_{CF}=10,5$  Гц), 127,18, 125,30 (д,  $J_{CF}=4,7$  Гц), 121,77, 114,14, 110,60, 108,56 (д,  $J_{CF}=19,2$  Гц), 105,88, 72,19, 68,34, 55,06, 45,58, 29,16 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{20}H_{21}BrFN_4O_2^+$ , 447,0826; обнаружено 447,0820.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин ((±)-JGK070).



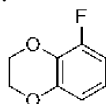
После общей процедуры GP-1 соединение (±)-JGK070 получали из (±)-10 (32 мг, 0,06 ммоль) и 1-метилпиперазина (36 мкл, 0,32 ммоль) в DMF (1,3 мл). ПТСХ (EtOAc/iPrOH 8:2, 1,5% водн. раствор  $NH_4OH$ ) обеспечивала получение (±)-JGK070 (21 мг, 65%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,66 (с, 1H), 8,62 (ддд,  $J=8,5, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,373 (уш, 1H), 7,367 (с, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,09 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,43 (дд,  $J=11,4, 2,3$  Гц, 1H), 4,37 (ттд,  $J=7,7, 5,4, 2,3$  Гц, 1H), 4,08 (дд,  $J=11,4, 7,9$  Гц, 1H), 2,68-2,54 (м, 2H), 2,50 (уш, 8H), 2,30 (с, 3H), 1,94 (дтд,  $J=13,6, 7,5, 6,0$  Гц, 1H), 1,86 м.д. (дтд,  $J=14,2, 7,3, 5,3$  Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155,86, 153,27, 150,16 (д,  $J_{CF}=242,5$  Гц), 149,41, 146,64, 144,37, 128,64 (д,  $J_{CF}=10,3$  Гц), 127,22, 125,28 (д,  $J_{CF}=4,6$  Гц), 121,81, 114,13, 110,60, 108,57 (д,  $J_{CF}=19,4$  Гц), 105,88, 72,38, 68,36, 55,20, 53,77, 53,25, 46,11, 28,50 м.д.;

МСВР (ИЭР):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{23}H_{26}BrFN_5O_2^+$ , 502,1248; обнаружено 502,1261.

## 5-Фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин (11).



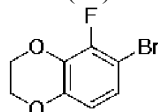
Смесь 3-фторбензол-1,2-диола (7233 мг, 56,5 ммоль) в DMF (113 мл) обрабатывали с помощью  $K_2CO_3$  (19514 мг, 141 ммоль), перемешивали в течение 10 мин при 23°C и обрабатывали с помощью 1-бром-2-хлорэтана (9,4 мл, 113 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч и затем при 95°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до 23°C, разбавляли водой (150 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (90 мл), солевым раствором (90 мл), сушили ( $Na_2SO_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 30:1→10:1) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 11 (7973 мг, 92%) в виде прозрачного бесцветного масла.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,78-6,63 (м, 3H), 4,34-4,26 м.д. (м, 4H);

$^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  152,05 (д,  $J_{CF}=244,3$  Гц), 145,27 (д,  $J_{CF}=3,8$  Гц), 132,78 (д,  $J_{CF}=13,9$  Гц), 120,02 (д,  $J_{CF}=8,9$  Гц), 112,74 (д,  $J_{CF}=3,1$  Гц), 108,52 (д,  $J_{CF}=18,1$  Гц), 64,50, 64,45 м.д.;

МСВР (DART): m/z  $[M]^+$  расщ. для  $C_8H_7FO_2^+$ , 154,0425; обнаружено 154,0420.

6-Бром-5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин (12).



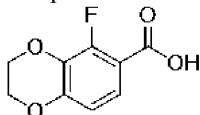
Раствор 11 (7812 мг, 50,7 ммоль) в MeOH (101 мл) обрабатывали с помощью NBS (9022 мг, 50,7 ммоль) и нагревали при 70°C в течение 30 мин. Смесь охлаждали до 23°C и концентрировали. Остаток растворяли в ДХМ (700 мл), промывали водой (300 мл), сушили ( $MgSO_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 30:1→20:1) с последующей сушкой под высоким вакуумом при 100°C для удаления любого оставшегося исходного материала обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 12 (8807 мг, 75%, содержащего около 15% региоизомера) в виде прозрачного бесцветного масла, которое затвердевало в морозилке с получением грязно-белого твердого вещества.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,96 (дд,  $J=9,0, 7,0$  Гц, 1H), 6,59 (дд,  $J=9,0, 2,0$  Гц, 1H), 4,35-4,24 м.д. (м, 4H);

$^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  148,87 (д,  $J_{CF}=245,1$  Гц), 144,53 (д,  $J_{CF}=3,5$  Гц), 133,81 (д,  $J_{CF}=14,6$  Гц), 123,31, 113,39 (д,  $J_{CF}=3,6$  Гц), 109,17 (д,  $J_{CF}=19,3$  Гц), 64,51, 64,34 м.д.;

МСВР (DART): m/z  $[M]^+$  расщ. для  $C_8H_6BrFO_2^+$ , 231,9530; обнаружено 231,9525.

5-Фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (13).



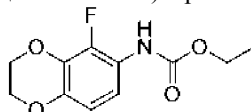
Смесь 12 (7,0 г, 30,0 ммоль) в ТГФ (108 мл) охлаждали до -78°C и по каплям обрабатывали с помощью 2,5 М раствора nBuLi в гексанах (12,02 мл, 30,0 ммоль) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при -78°C в течение 30 мин и затем переносили посредством канюли на раздробленный сухой лед (промывали канюлю с помощью 10 мл ТГФ). Смеси позволяли нагреться до 23°C и концентрировали. Воду (200 мл) и 1 М NaOH (50 мл) добавляли к остатку и водн. фазу экстрагировали с помощью  $Et_2O$  (3×60 мл). Водн. фазу подкисляли с помощью 6 М HCl (15 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×150 мл). Объединенные органические вещества промывали солевым раствором (150 мл), сушили ( $MgSO_4$ ), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/EtOAc 7:3→3:7) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 13 (3591 мг, 60%) в виде белого твердого вещества.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  12,90 (уш, 1H), 7,33 (дд,  $J=8,9, 7,7$  Гц, 1H), 6,78 (дд,  $J=8,9, 1,7$  Гц, 1H), 4,39-4,29 м.д. (м, 4H);

$^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  164,65 (д,  $J_{CF}=3,0$  Гц), 151,21 (д,  $J_{CF}=257,5$  Гц), 148,50 (д,  $J_{CF}=4,4$  Гц), 132,68 (д,  $J_{CF}=13,6$  Гц), 122,44 (д,  $J_{CF}=1,4$  Гц), 112,12 (д,  $J_{CF}=3,4$  Гц), 111,97 (д,  $J_{CF}=7,3$  Гц), 64,42, 63,91 м.д.;

МСВР (DART): m/z  $[M-H]^-$  расщ. для  $C_9H_6FO_4^-$ , 197,0256; обнаружено 197,0250.

Этил-(5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил)карбамат (14).



Смесь 13 (650 мг, 3,28 ммоль) в толуоле (13,1 мл) обрабатывали с помощью  $Et_3N$  (1,4 мл, 9,84 ммоль) и при 10°C с помощью DPPA (780 мкл, 3,62 ммоль). Смесь перемешивали при 23°C в течение 30 мин, затем при 85°C в течение 1,5 ч. Смесь охлаждали до 23°C, обрабатывали с помощью EtOH (5 мл), перемешивали в течение 1,5 ч при 23°C и концентрировали. Остаток растворяли в  $Et_2O$  (150 мл), промывали насыщ. водн. раствором  $NaHCO_3$  (40 мл), водой (40 мл), солевым раствором (40 мл), сушили



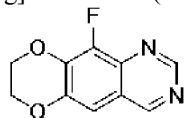
(MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. ФХ (гексаны/ДХМ 7:3→1:9) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения 14 (512 мг, 65%) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (уш, 1H), 6,64 (д, J=9,2, 2,2 Гц, 1H), 6,56 (уш, 1H), 4,32-4,24 (м, 4H), 4,22 (q, J=7,1 Гц, 2H), 1,31 м.д. (т, J=7,1 Гц, 3H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,80, 142,61 (д, J<sub>CF</sub>=246,0 Гц), 140,82, 132,66 (д, J<sub>CF</sub>=12,4 Гц), 120,36 (д, J<sub>CF</sub>=6,9 Гц), 112,36, 111,81 (д, J<sub>CF</sub>=3,7 Гц), 64,72, 64,29, 61,61, 14,66 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> рассч. для C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>FNO<sub>4</sub><sup>+</sup>, 242,0823; обнаружено 242,0816.

10-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (15).



Смесь 14 (450 мг, 1,87 ммоль) и НМТА (263 мг, 1,87 ммоль) в TFA (5,7 мл) подвергали микроволновому излучению при 110°C в течение 10 мин. Смесь охлаждали до 23°C, разбавляли водой (60 мл), обрабатывали с помощью 6 М NaOH (12 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×60 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (50 мл), солевым раствором (50 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали с получением пенистого желтого масла.

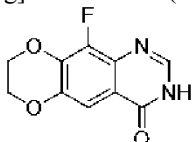
Смесь масла в 10% KOH в диоксане/воде 1:1 (15,5 мл) обрабатывали с помощью [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (614 мг, 1,87 ммоль) и подвергали микроволновому излучению при 100°C в течение 10 мин. Эту процедуру повторяли всего четыре раза (4 цикла добавления 1 экв. ферроцианида калия с последующим микроволновым излучением). Полученную смесь разбавляли водой (160 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×120 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (100 мл), солевым раствором (100 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 15 (330 мг, 86%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,21 (уш, 1H), 9,19 (с, 1H), 7,18 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,53-4,41 м.д. (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,06 (д, J<sub>CF</sub>=2,9 Гц), 153,81 (д, J<sub>CF</sub>=1,8 Гц), 145,76 (д, J<sub>CF</sub>=2,9 Гц), 144,40 (д, J<sub>CF</sub>=256,1 Гц), 138,56 (д, J<sub>CF</sub>=11,0 Гц), 136,73 (д, J<sub>CF</sub>=10,1 Гц), 119,81 (д, J<sub>CF</sub>=2,7 Гц), 106,55 (д, J<sub>CF</sub>=4,3 Гц), 64,78, 64,34 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> рассч. для C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 207,0564; обнаружено 207,0563.

10-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4(3H)-он (16).



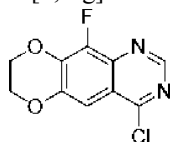
Раствор 15 (306 мг, 1,48 ммоль) в AcOH (1 мл) по каплям обрабатывали с помощью 0,833 М раствора CAN в воде (7,12 мл, 5,94 ммоль) и перемешивали при 23°C в течение 15 мин. Белый осадок собирали фильтрацией и промывали водой (2×2 мл), ацетонитрилом (2×2 мл), ДХМ (2 мл) и Et<sub>2</sub>O (2 мл) с получением первой партии указанного в заголовке соединения. Водн. фильтрат нейтрализовали до pH~7 с помощью 1 М NaOH и белый осадок собирали фильтрацией, как и раньше, с последующей промывкой с получением второй партии указанного в заголовке соединения 16 (81 мг, 25%) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,19 (уш, 1H), 7,98 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 4,52-4,28 м.д. (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 159,31, 144,58 (д, J<sub>CF</sub>=251,8 Гц), 144,28, 143,80 (д, J<sub>CF</sub>=3,4 Гц), 137,86 (д, J<sub>CF</sub>=11,1 Гц), 132,94 (д, J<sub>CF</sub>=8,9 Гц), 115,75, 106,62 (д, J<sub>CF</sub>=3,7 Гц), 64,57, 64,02 м.д.;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> рассч. для C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 223,0513; обнаружено 223,0503.

4-Хлор-10-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (17).



Перемешиваемую суспензию 16 (92 мг, 0,41 ммоль) в толуоле (1,2 мл) обрабатывали с помощью DIPEA (220 мкл, 1,26 ммоль) с последующим добавлением по каплям POCl<sub>3</sub> (103 мкл, 1,12 ммоль) при 10°C. Смесь перемешивали при 23°C в течение 1 ч, затем при 90°C в течение 5 ч и концентрировали. Остаток обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора NaHCO<sub>3</sub> (10 мл) при 0°C в течение 5 мин, разбавляли водой (5 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ (3×7 мл). Объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора NaHCO<sub>3</sub> (7 мл), солевым раствором (7 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 17 (51 мг, 51%) в виде светло-коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо

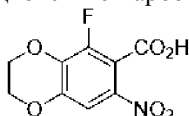
дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,90 (с, 1H), 7,51 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 4,55-4,43 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160,48 (д,  $J_{\text{CF}}=4,3$  Гц), 152,31, 146,29 (д,  $J_{\text{CF}}=3,3$  Гц), 144,63 (д,  $J_{\text{CF}}=256,2$  Гц), 138,95 (д,  $J_{\text{CF}}=11,3$  Гц), 137,68 (д,  $J_{\text{CF}}=10,2$  Гц), 118,56 (д,  $J_{\text{CF}}=2,4$  Гц), 105,82 (д,  $J_{\text{CF}}=4,2$  Гц), 64,81, 64,41 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расч. для  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClFN}_2\text{O}_2^+$ , 241,0175; обнаружено 241,0174.

5-Фтор-7-нитро-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (18).



Смесь 13 (1500 мг, 7,57 ммоль) в  $\text{AcOH}$  (7,5 мл) по каплям обрабатывали с помощью  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2,02 мл) при  $10^\circ\text{C}$ . Тщательно перемешанную смесь по каплям обрабатывали с помощью 65%  $\text{HNO}_3$  (2,6 мл) при  $0^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 30 мин и затем при  $23^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. Смесь выливали в ледяную воду (40 мл) и белый осадок собирали фильтрацией (промывки холодной водой, 40 мл) и сушили в осушителе с получением указанного в заголовке соединения 18 (1280 мг, 70%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  14,09 (уш, 1H), 7,62 (д,  $J=1,7$  Гц, 1H), 4,52-4,40 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  162,71, 147,16 (д,  $J_{\text{CF}}=248,7$  Гц), 144,72 (д,  $J_{\text{CF}}=5,1$  Гц), 138,15 (д,  $J_{\text{CF}}=13,7$  Гц), 137,10 (д,  $J_{\text{CF}}=6,6$  Гц), 113,44 (д,  $J_{\text{CF}}=20,3$  Гц), 109,52 (д,  $J_{\text{CF}}=2,3$  Гц), 64,97, 64,48 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  расч. для  $\text{C}_9\text{H}_5\text{FNO}_6^-$ , 242,0106; обнаружено 242,0124.

7-Амино-5-фтор-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбоновая кислота (19).



Смесь 18 (500 мг, 2,06 ммоль) и 5%  $\text{Pd/C}$  (223 мг, 0,10 ммоль) в  $\text{MeOH}$  (21 мл) перемешивали в атмосфере  $\text{H}_2$  при  $23^\circ\text{C}$  в течение 13,5 ч. Смесь фильтровали через целит (промывки с помощью  $\text{EtOH}$ ) и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 19 (418 мг, 95%) в виде серого твердого вещества, которое не выглядело очень стабильным.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,35 (уш, 2H), 6,04 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 4,29-4,24 (м, 2H), 4,19-4,14 м.д. (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  167,36 (д,  $J_{\text{CF}}=2,9$  Гц), 151,36 (д,  $J_{\text{CF}}=252,0$  Гц), 148,86 (д,  $J_{\text{CF}}=7,0$  Гц), 145,81 (д,  $J_{\text{CF}}=5,7$  Гц), 122,88 (д,  $J_{\text{CF}}=15,4$  Гц), 97,19 (д,  $J_{\text{CF}}=2,9$  Гц), 95,37 (д,  $J_{\text{CF}}=10,9$  Гц), 64,95, 63,58 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расч. для  $\text{C}_9\text{H}_5\text{FNO}_4^+$ , 214,0510; обнаружено 214,0508.

5-Фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4(3H)-он (20).



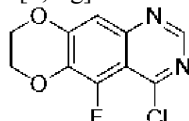
Смесь 19 (417 мг, 1,96 ммоль) в формамиде (2,3 мл, 58,7 ммоль) перемешивали при  $120-125^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. Смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и обрабатывали с помощью воды (4 мл), перемешивали в течение 30 мин, разбавляли водой (4 мл) и фильтровали. Остаток промывали холодной водой ( $3 \times 5$  мл) и сушили над Drierite под высоким вакуумом с получением указанного в заголовке соединения 20 (249 мг, 57%) в виде грязно-белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  12,00 (уш, 1H), 7,90 (д,  $J=3,6$  Гц, 1H), 6,93 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 4,45-4,35 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  157,64 (д,  $J_{\text{CF}}=3,0$  Гц), 149,70 (д,  $J_{\text{CF}}=6,0$  Гц), 148,45 (д,  $J_{\text{CF}}=261,3$  Гц), 144,60, 142,99, 131,47 (д,  $J_{\text{CF}}=12,7$  Гц), 108,76 (д,  $J_{\text{CF}}=3,5$  Гц), 106,38 (д,  $J_{\text{CF}}=3,8$  Гц), 64,69, 63,98 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расч. для  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FN}_2\text{O}_3^+$ , 223,0513; обнаружено 223,0510.

4-Хлор-5-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин (21).



Перемешиваемую суспензию 20 (90 мг, 0,41 ммоль) в толуоле (1,2 мл) обрабатывали с помощью DIPEA (215 мкл, 1,24 ммоль) с последующим добавлением по каплям  $\text{POCl}_3$  (100 мкл, 1,09 ммоль) при  $10^\circ\text{C}$ . Смесь перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, затем при  $88^\circ\text{C}$  в течение 5 ч и концентрировали. Остаток обрабатывали с помощью насыщ. водн. раствора  $\text{NaHCO}_3$  (10 мл) при  $0^\circ\text{C}$ , разбавляли водой (5 мл) и экстрагировали с помощью ДХМ ( $3 \times 7$  мл). Объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора  $\text{NaHCO}_3$  (7 мл), соевым раствором (7 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), филь-

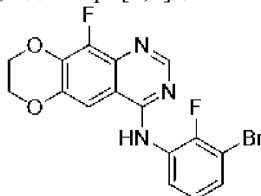
тровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения 21 (96 мг, 99%) в виде светло-оранжевого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,83 (с, 1H), 7,35 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 4,51-4,45 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,76 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 152,70 (д,  $J_{\text{CF}}=2,3$  Гц), 151,66 (д,  $J_{\text{CF}}=4,9$  Гц), 146,08, 144,51 (д,  $J_{\text{CF}}=261,8$  Гц), 134,04 (д,  $J_{\text{CF}}=14,0$  Гц), 110,85 (д,  $J_{\text{CF}}=7,7$  Гц), 109,43 (д,  $J_{\text{CF}}=4,0$  Гц), 64,89, 64,37 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClFN}_2\text{O}_2^+$ , 241,0175; обнаружено 241,0176.

N-(3-Бром-2-фторфенил)-10-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK071).



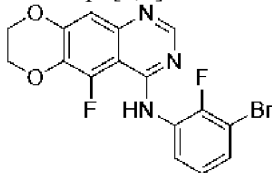
После общей процедуры GP-2 соединение JGK071 получали из хлорхиназолина 17 (35 мг, 0,15 ммоль) и 3-бром-2-фторанилина. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0→8:2) обеспечивала получение JGK071 (44 мг, 77%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,76 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 7,80 (д,  $J=1,8$  Гц, 1H), 7,62 (ддд,  $J=8,0, 6,3, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,5, 7,1, 1,6$  Гц, 1H), 7,22 (тд,  $J=8,0, 1,2$  Гц, 1H), 4,53-4,40 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  156,93 (д,  $J_{\text{CF}}=3,7$  Гц), 153,44 (д,  $J_{\text{CF}}=247,5$  Гц), 153,12, 144,04 (д,  $J_{\text{CF}}=250,0$  Гц), 143,97 (д,  $J_{\text{CF}}=3,2$  Гц), 137,04 (д,  $J_{\text{CF}}=10,9$  Гц), 135,62 (д,  $J_{\text{CF}}=9,9$  Гц), 130,48, 127,89, 127,62 (д,  $J_{\text{CF}}=13,1$  Гц), 125,51 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 108,58 (д,  $J_{\text{CF}}=23,4$  Гц), 108,51, 103,25 (д,  $J_{\text{CF}}=3,9$  Гц), 64,63, 64,21 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$ , 393,9997; обнаружено 393,9999.

N-(3-Бром-2-фторфенил)-5-фтор-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK072).



После общей процедуры GP-2 соединение JGK072 получали из хлорхиназолина 21 (35 мг, 0,15 ммоль) и 3-бром-2-фторанилина. ФХ (ДХМ/EtOAc 1:0→8:2) обеспечивала получение JGK072 (47 мг, 82%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,67 (ддд,  $J=8,6, 7,2, 1,5$  Гц, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,52 (дд,  $J=19,6, 2,2$  Гц, 1H), 7,29 (ддд,  $J=8,1, 6,4, 1,5$  Гц, 1H), 7,23 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,10 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 4,48-4,42 м.д. (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,27 (д,  $J_{\text{CF}}=5,2$  Гц), 153,90, 150,34 (д,  $J_{\text{CF}}=243,9$  Гц), 149,93 (д,  $J_{\text{CF}}=6,2$  Гц), 145,75 (д,  $J_{\text{CF}}=250,3$  Гц), 144,78, 131,96 (д,  $J_{\text{CF}}=15,6$  Гц), 128,43 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,71, 125,20 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 122,48, 109,69 (д,  $J_{\text{CF}}=3,3$  Гц), 108,63 (д,  $J_{\text{CF}}=19,2$  Гц), 101,42 (д,  $J_{\text{CF}}=7,2$  Гц), 64,84, 64,48 м.д.;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$ , 393,9997; обнаружено 393,9996.

Пример 17. Проникновение в головной мозг иллюстративных соединений по изобретению.

В табл. 4 раскрыто процентное соотношение между головным мозгом и плазмой крови и несвязанные отношения лекарственных средств в головном мозге к плазме крови указанных лекарственных средств у мышей, не несущих опухоли.

Таблица 4

Проникновение в головной мозг иллюстративных соединений по изобретению

Соединение	Проникновение в головной мозг (% плазмы крови)	Круи (Avg)
Эрлотиниб	8,50	0,051
JGK005	64,8	0,491
JGK038	84,3	0,575
JGK028	106,2	1,037
JGK010	106,4	1,045
JGK037	212,1	1,301
JGK042	167,6	1,033
JGK063	72,5	0,341
JGK066	274,3	1,175
JGK068	354,5	1,184
JGK068S	378,3	1,181
JGK074	166,2	не обнаружено
JGK083S	231,3	0,798

Пример 18. Получение иллюстративных соединений серии JGK.

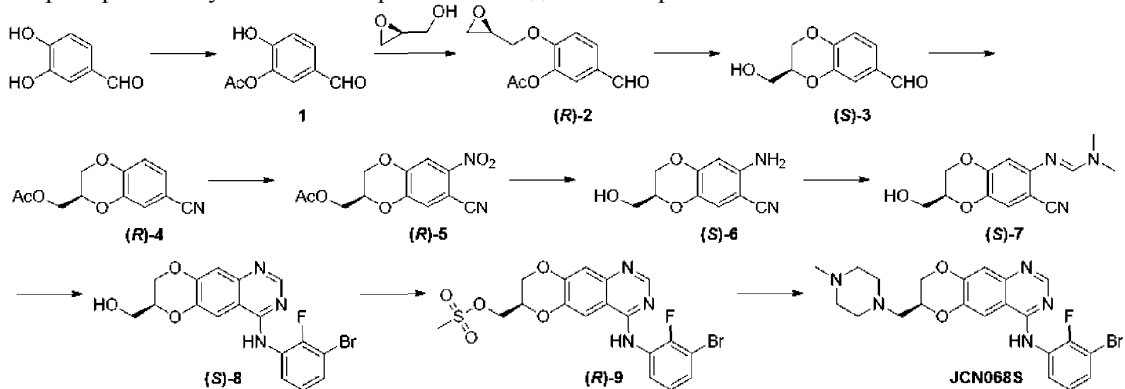


Схема 1. Синтез JGK068S

Получение (R)-энантиомера JGK068R или рацемических смесей (JGK068) происходит аналогичным способом, как показано на схеме 1, но использует (R)-или рацемический глицидол соответственно.

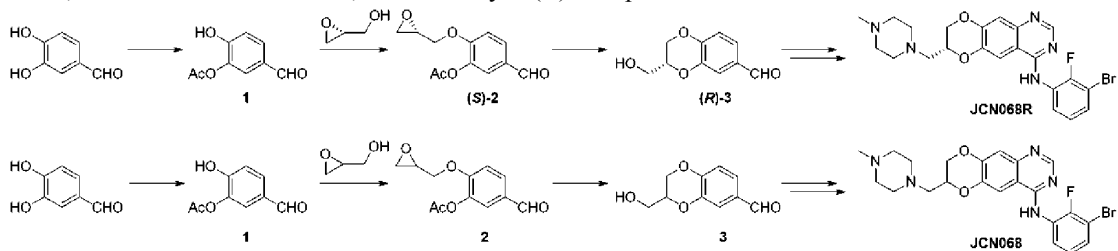


Схема 2

Синтез бензодиоксанкарбальдегида (R)-10 на одной стадии из бензальдегида 1 хиральным глицидилтозилатом. В этом способе отсутствует реакция Мицунобу на схеме 1 (получение 2 из 1). Соединение (R)-10 может использоваться в способе, показанном на схеме 1, для получения JGK068S.

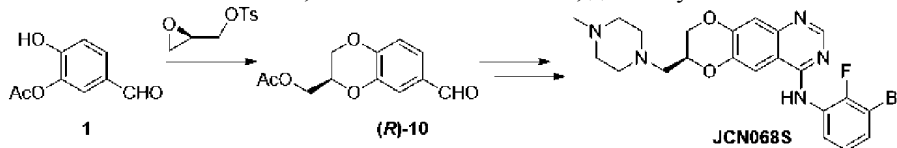


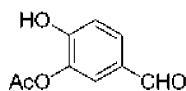
Схема 3

Общая химическая информация.

Все химические вещества, реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников, когда они были доступны, и использовались в том виде, в котором они были получены. При необходимости реагенты и растворители очищали и сушили стандартными методами. Реакции, чувствительные

к воздуху и влаге, проводили в инертной атмосфере аргона в высушенной в печи стеклянной посуде. Реакции с микроволновым облучением проводили в однорежимном реакторе микроволнового синтезатора SEM Discover. Реакции при комнатной температуре (к. т.) проводили при температуре окружающей среды (приблизительно 23°C). Все реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинах силикагеля Merck 60 F<sub>254</sub> с пятнами, визуализированными УФ-светом ( $\lambda=254, 365$  нм) или с использованием щелочного раствора KMnO<sub>4</sub>. Колоночную флэш-хроматографию (ФХ) проводили на SiO<sub>2</sub> 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, 230-400 меш). Препаративную тонкослойную хроматографию (ПТСХ) проводили с пластинами силикагеля Merck 60 F<sub>254</sub> (20×20 см, 210-270 мм) или пластинами для ТСХ Analtech Silica Gel GF (20×20 см, 1000 мм). Концентрирование при пониженном давлении (в вакууме) проводили на роторном испарителе при 23-50°C. Очищенные соединения дополнительно сушили в высоком вакууме или в осушителе. Выходы соответствуют очищенным соединениям и не были дополнительно оптимизированы. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H ЯМР) регистрировали на спектрометрах Bruker (работающих при 300, 400 или 500 МГц). Спектры ЯМР углерода (<sup>13</sup>C ЯМР) записывали на спектрометрах Bruker (при 400 или 500 МГц). Химические сдвиги ЯМР ( $\delta$  ppm) относили к сигналам остаточного растворителя. Данные <sup>1</sup>H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг в ppm; множественность (s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, quint=КВННТеТ, m=мультиплет/смешанный тип, td=триплет дублетов, ddd=дублет дублетов дублетов, br=широкий сигнал); постоянные взаимодействия (J) в Гц, интегрирование. Данные для спектров ЯМР <sup>13</sup>C представлены в зависимости от химического сдвига и, если применимо, постоянных взаимодействий. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) записывали на Thermo Fisher Scientific Exactive Plus с исходным масс-спектрометром IonSense ID-CUBE DART или на масс-спектрометре Waters LCT Premier с ACQUITY UPLC с автопробоотборником.

5-Формил-2-гидроксифенилацетат (1).



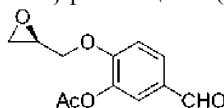
Смесь 3,4-дигидроксibenзальдегида (100 г, 0,724 моль) в ТГФ (965 мл) охлаждали до 0°C и обрабатывали с помощью 10% водн. раствора NaOH (724 мл, 1,81 моль) в течение 4-5 мин. После перемешивания реакционной смеси при 0°C в течение 15 мин ангидрид уксусной кислоты (Ac<sub>2</sub>O, 82,1 мл, 0,869 моль) добавляли по каплям в течение 20 мин. Смесь перемешивали в течение 30 мин при такой же температуре и затем выливали в смесь EtOAc (1,25 л) и 2 М HCl (1,13 л) при 0°C. Фазы разделяли и водн. фазу экстрагировали с помощью EtOAc (4×250 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (2×500 мл), соевым раствором (500 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Остаток обрабатывали с помощью небольшого количества н-гептана и выпаривали (3×). Повторная кристаллизация EtOAc (275 мл; кристаллы промывали с помощью Et<sub>2</sub>O) обеспечивала первую партию указанного в заголовке соединения 1 (66,96 г, 51%) в виде светло-коричневых кристаллов. Повторная кристаллизация исходного раствора из EtOAc обеспечивала вторую партию указанного в заголовке соединения 1 (29,436 г, 23%) в виде светло-коричневого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9,85 (с, 1H), 7,73-7,65 (м, 2H), 7,11 (д, J=8,8 Гц, 1H), 6,34 (шир., 1H), 2,39 (с, 3H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190,40, 168,99, 152,96, 138,81, 130,24, 129,72, 124,13, 117,87, 21,09;

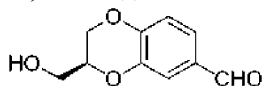
МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, 181,0495; обнаружено 181,0488.

5-Формил-2-{{(2R)-оксиран-2-ил}метокс}фенилацетат ((R)-2).



Смесь 1 (32,5 г, 0,18 моль) и трифенилфосфина (PPh<sub>3</sub>, 70,976 г, 0,27 моль) в ТГФ (905 мл) обрабатывали с помощью (S)-глицидола (17,95 мл, 0,27 моль), охлаждали до 0°C и по каплям обрабатывали с помощью диизопропилазодикарбоксилата (DIAD, 56,8 мл, 0,289 ммоль) в течение 30 мин. Смесь перемешивали в течение дополнительных 10 мин при 0°C, после чего охлаждающую баню удаляли и перемешивание продолжали при 23°C в течение 15,5 ч. Все летучие вещества выпаривали и неочищенный (R)-2, полученный в виде коричневого масла, использовали без какой-либо дополнительной очистки на следующей стадии.

(3S)-3-(Гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбальдегид ((S)-3).



Смесь неочищенного (R)-2 в MeOH (1,564 л) обрабатывали с помощью K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49,87 г, 0,36 моль) и перемешивали при 23°C в течение 18,5 ч и затем растворитель выпаривали. Остаток суспендировали в полунасыщ. NH<sub>4</sub>Cl (750 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×500 мл). Объединенные органические

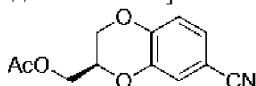
ские вещества промывали водой (250 мл), соевым раствором (250 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Неочищенный материал очищали с помощью нескольких циклов флэш-хроматографии (гексаны/ $\text{EtOAc}$  9:1→1:1), а также путем преципитации из гексанов/ $\text{Et}_2\text{O}$  1:1 (для удаления трифенилфосфиноксида  $\text{Ph}_3\text{PO}$ ), с получением указанного в заголовке соединения (S)-3 (17,322 г, 49% с двух стадий) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,81 (с, 1H), 7,43 (д,  $J=1,8$  Гц, 1H), 7,41 (дд,  $J=8,1, 1,9$  Гц, 1H), 7,00 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,39 (дд,  $J=11,4, 2,3$  Гц, 1H), 4,31-4,25 (м, 1H), 4,20 (дд,  $J=11,3, 7,9$  Гц, 1H), 3,95 (дд,  $J=12,1, 4,3$  Гц, 1H), 3,87 (дд,  $J=12,1, 4,9$  Гц, 1H), 2,18 (шир., 1H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  190,79, 148,76, 143,46, 130,79, 124,46, 118,33, 117,70, 73,31, 65,61, 61,54;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4^+$ , 195,0652; обнаружено 195,0650.

[(2R)-7-Циано-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]метилацетат ((R)-4).



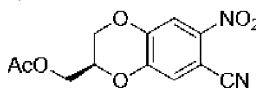
Смесь (S)-3 (17,322 г, 0,089 моль) в  $\text{AcOH}$  (189 мл) обрабатывали с помощью  $\text{KOAc}$  (22,944 г, 0,234 моль), перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 10 мин и затем обрабатывали с помощью  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (16,233 г, 0,234 моль). Полученную смесь перемешивали при  $120\text{--}125^\circ\text{C}$  в течение 18,5 ч. Смесь охлаждали до  $23^\circ\text{C}$ , выливали в воду (1 л) и экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $4\times 250$  мл). Объединенные органические вещества обрабатывали с помощью 3,5 М  $\text{NaOH}$  (400 мл) и насыщ. водн. раствора  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл) с получением конечного  $\text{pH}\sim 8$ , и эмульсию перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Органический слой отделяли и промывали насыщ. водн. раствором  $\text{NaHCO}_3$  (300 мл), водой (300 мл), соевым раствором (300 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством флэш-хроматографии (гексаны/ $\text{EtOAc}$  10:1→6:4) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (R)-4 (13,513 г, 65%) в виде прозрачного бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,20 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,16 (дд,  $J=8,4, 2,0$  Гц, 1H), 6,94 (д,  $J=8,4$  Гц, 1H), 4,43-4,38 (м, 1H), 4,36 (дд,  $J=11,6, 2,4$  Гц, 1H), 4,34 (дд,  $J=11,1, 4,5$  Гц, 1H), 4,30 (дд,  $J=11,6, 4,6$  Гц, 1H), 4,11 (дд,  $J=11,5, 7,2$  Гц, 1H), 2,12 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,64, 147,13, 143,11, 126,28, 121,56, 118,85, 118,32, 105,13, 71,11, 65,45, 62,24, 20,83;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_4^+$ , 234,0761; обнаружено 234,0759.

[(2R)-7-Циано-6-нитро-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]метилацетат ((R)-5).



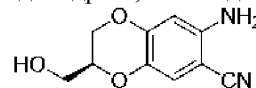
Смесь (R)-4 (13,345 г, 57,2 ммоль) в  $\text{Ac}_2\text{O}$  (74,3 мл) обрабатывали с помощью  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3,05 мл, 57,2 ммоль), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и по каплям обрабатывали с помощью 70%  $\text{HNO}_3$  (19,63 мл, 286 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  в течение 35 мин. Смесь перемешивали в течение других 2 ч при  $0^\circ\text{C}$  и затем при  $23^\circ\text{C}$  в течение 3,5 ч. Смесь выливали в ледяную воду (850 мл) и  $\text{pH}$  регулировали до  $\sim 7$  с помощью 6 М  $\text{NaOH}$  (320 мл). Насыщ. водн. раствор  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3\times 500$  мл). Объединенные органические вещества промывали насыщ. водн. раствором  $\text{NaHCO}_3$  (400 мл), водой (400 мл), соевым раствором (400 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (R)-5 (15,696 г, 99%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  7,96 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 4,73-4,67 (м, 1H), 4,58 (дд,  $J=11,8, 2,6$  Гц, 1H), 4,36 (дд,  $J=12,5, 3,7$  Гц, 1H), 4,31 (дд,  $J=12,5, 5,7$  Гц, 1H), 4,27 (дд,  $J=11,8, 7,0$  Гц, 1H), 2,05 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  170,11, 147,75, 146,26, 142,23, 123,77, 115,21, 115,17, 100,06, 72,00, 64,98, 61,72, 20,52;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_6^+$ , 279,0612; обнаружено 279,0601.

(3S)-7-Амино-3-(гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-карбонитрил ((S)-6).



Суспензию (R)-5 (15,591 г, 56 ммоль) в воде/этаноле 1:1 (250 мл) обрабатывали с помощью  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (39,266 г, 185 ммоль) и смесь перемешивали при  $50^\circ\text{C}$  в течение 105 мин. и затем нагревали до  $70^\circ\text{C}$  в течение 2 ч с одновременной обработкой порциями конц.  $\text{HCl}$  (73,6 мл, 0,897 моль) в это время. Смесь охлаждали до  $23^\circ\text{C}$ , выливали на лед и  $\text{pH}$  регулировали до  $\sim 10$  с помощью 6 М  $\text{NaOH}$  (200 мл) и полунасыщ.  $\text{NaHCO}_3$  (500 мл). Смесь экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  ( $3\times 500$  мл). Объединенные органические вещества промывали водой (500 мл), соевым раствором (500 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали с получением неочищенного (S)-6 (9,483 г, 82%) в виде оранжево-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

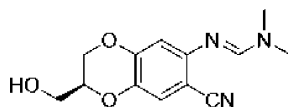
$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  6,92 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 5,50 (шир., 2H), 5,04 (т,  $J=5,7$  Гц, 1H), 4,32

(дд,  $J=10,7, 1,6$  Гц, 1H), 4,07-3,99 (м, 1H), 4,00 (дд,  $J=11,2, 8,3$  Гц, 1H), 3,64-3,51 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  148,50, 147,29, 134,39, 119,04, 118,04, 102,45, 86,72, 73,25, 65,92, 59,77;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3^+$ , 206,0686; обнаружено 206,0685.

$\text{N}^1$ -[(2S)-7-Циано-2-(гидроксиметил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил]-N,N-диметилметан-имидамид ((S)-7).



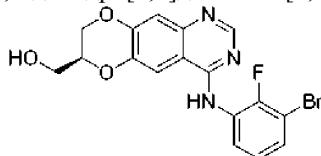
Смесь (S)-6 (9,38 г, 45,5 ммоль) в толуоле (117 мл) обрабатывали с помощью  $\text{AcOH}$  (143 мкл, 2,5 ммоль) и  $\text{DMF-DMA}$  (13,1 мл, 98,9 ммоль) и смесь перемешивали при  $105^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Выпаренный  $\text{MeOH}$  (~4-5 мл) собирали в насадке Дина-Старка для отслеживания хода реакции. Смесь охлаждали до  $23^\circ\text{C}$  и выпаривали с получением неочищенного (S)-7 (14,243 г, колич.) в виде вязкого коричневого масла, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,51 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,48 (с, 1H), 4,33 (дд,  $J=11,2, 2,0$  Гц, 1H), 4,23-4,17 (м, 1H), 4,13 (дд,  $J=11,2, 8,1$  Гц, 1H), 3,90 (дд,  $J=12,1, 4,2$  Гц, 1H), 3,83 (дд,  $J=12,1, 4,8$  Гц, 1H), 3,07 (с, 3H), 3,05 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160,40, 153,78, 147,68, 138,63, 121,08, 118,64, 108,16, 99,31, 73,34, 65,83, 61,67, 40,51, 34,82;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3^+$ , 262,1186; обнаружено 262,1183.

[(7S)-4-(3-Бром-2-фторанино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метанол ((S)-8).



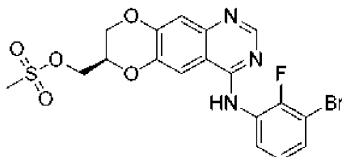
Смесь (S)-7 в  $\text{AcOH}$  (152 мл) обрабатывали с помощью 3-бром-2-фторанилина (6,63 мл, 59,1 ммоль) и смесь перемешивали при  $125-130^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Смесь охлаждали до  $23^\circ\text{C}$ , выливали в ледяную воду (500 мл) и pH регулировали до ~9 насыщ. водн. раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$  (185 мл) и полунасыщ. водн. раствором  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл). Смесь экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  (3×400 мл) и объединенные органические вещества промывали с помощью полунасыщ. водн. раствора  $\text{NaHCO}_3$  (400 мл), водой (400 мл), соевым раствором (400 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Остаток растворяли в  $\text{MeOH}$  (272 мл) и обрабатывали с помощью  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (12,579 г, 91 ммоль), перемешивали при  $23^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и выпаривали. Остаток суспендировали в полунасыщ. водн. растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (700 мл) и экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  (3×400 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), соевым раствором (400 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Оранжево-желтый остаток суспендировали в  $\text{EtOAc}$ , нагревали до  $65^\circ\text{C}$  и затем обеспечивали медленное охлаждение до  $23^\circ\text{C}$  в течение ночи. Фильтрация и промывка остатка холодными гексанами (2×15 мл) и  $\text{Et}_2\text{O}$  (2×15 мл) и высушивание под высоким вакуумом обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (S)-8 (9,407 г, 50,9% с двух стадий) в виде измельченного желтого порошка.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  9,69 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,2, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,4, 7,0, 1,6$  Гц, 1H), 7,24-7,17 (м, 1H), 7,20 (с, 1H), 5,20 (т,  $J=5,6$  Гц, 1H), 4,49 (дд,  $J=11,5, 2,4$  Гц, 1H), 4,37-4,29 (м, 1H), 4,21 (дд,  $J=11,6, 7,4$  Гц, 1H), 3,76-3,64 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  157,22, 153,38 (д,  $J_{\text{CF}}=247,0$  Гц), 153,09, 148,87, 145,94, 143,37, 130,08, 128,09 (д,  $J_{\text{CF}}=12,9$  Гц), 127,75, 125,43 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 112,29, 109,81, 108,54 (д,  $J_{\text{CF}}=20,0$  Гц), 108,49, 73,77, 65,52, 59,76;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$ , 406,0197; обнаружено 406,0185.

[(7R)-4-(3-Бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метилметансульфонат ((R)-9).

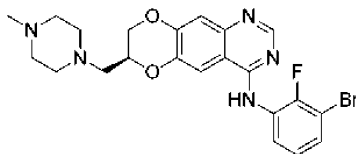


Смесь (S)-8 (9,01 г, 22,2 ммоль) и  $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$  (234 мг, 2,45 ммоль) в ацетонитриле (148 мл) обрабатывали с помощью  $\text{Et}_3\text{N}$  (6,18 мл, 44,4 ммоль), охлаждали до  $0-5^\circ\text{C}$  и по каплям обрабатывали с помощью раствора  $\text{MsCl}$  (2,57 мл, 33,2 ммоль) в ацетонитриле (17 мл; промывали с помощью 3 мл) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Воду (100 мл) добавляли и большую часть ацетонитрила выпаривали в вакууме. Дополнительно воду (700 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$  (3×400 мл). Объединенные органические вещества промывали водой (400 мл), соевым раствором (400 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке

соединения (R)-9 (10,33 г, 96%) в виде желтой рыхлой пены, которую использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (с, 1H), 8,62 (ддд, J=8,7, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,362 (с, 1H), 7,360 (шир., 1H), 7,29 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,67-4,61 (м, 1H), 4,54-4,51 (м, 2H), 4,50 (дд, J=11,7, 2,4 Гц, 1H), 4,29 (дд, J=11,8, 7,1 Гц, 1H), 3,13 (с, 3H).

(7S)-N-(3-бром-2-фторфенил)-7-[(4-Метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK068S).



Смесь (R)-9 в DMF (427 мл) обрабатывали с помощью 1-метилпиперазина (11,83 мл, 107 ммоль) и Et<sub>3</sub>N (5,95 мл, 42,7 ммоль), и смесь перемешивали при 85°C в течение 24 ч. Смесь охлаждали до 23°C и выпаривали. Остаток растворяли в EtOAc (1,2 л) и промывали с помощью 0,5 М NaOH (4×250 мл), соевым раствором (250 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством флеш-хроматографии (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:0→8:2) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения JGK068S (6,013 г, 58% с двух стадий) в виде грязно-белой рыхлой пены.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,67 (с, 1H), 8,63 (ддд, J=8,7, 7,3, 1,6 Гц, 1H), 7,374 (с, 1H), 7,372 (шир., 1H), 7,32 (с, 1H), 7,26 (ддд, J=8,1, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,09 (тд, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 4,48-4,40 (м, 2H), 4,14 (дд, J=11,8, 8,0 Гц, 1H), 2,77 (дд, J=13,4, 6,0 Гц, 1H), 2,653 (дд, J=13,4, 5,8 Гц, 1H), 2,648 (шир., 4H), 2,51 (шир., 4H), 2,32 (с, 3H).

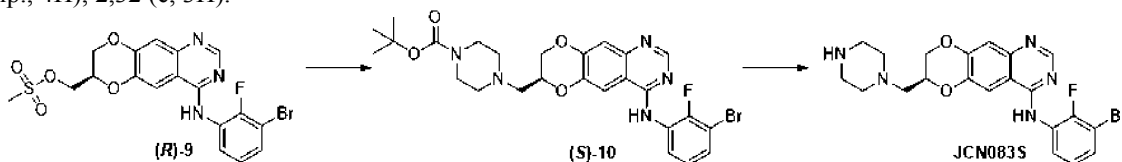
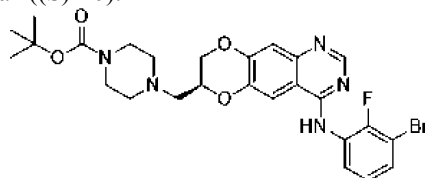


Схема 4. Синтез JGK083S

трет-Бутил-[(7S)-4-(3-бром-2-фторанилино)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-7-ил]метил}пиперазин-1-карбоксилат ((S)-10).



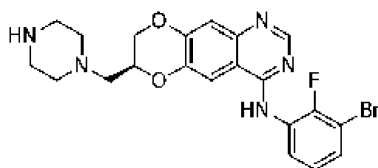
После общей процедуры GP-1 примера 16 соединение (S)-10 получали из R-9 (91 мг, 0,188 ммоль) и трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (175 мг, 0,94 ммоль) в DMF (3,8 мл) и перемешивали при 85°C в течение 15 ч. ПТСХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 4:6) обеспечивала получение (S)-10 (50 мг, 46%) в виде грязно-белой рыхлой пены.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (с, 1H), 8,65 (ддд, J=8,3, 7,4, 1,5 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,36 (шир., 1H), 7,31 (с, 1H), 7,27 (ддд, J=8,0, 6,5, 1,5 Гц, 1H), 7,11 (тд, J=8,2, 1,5 Гц, 1H), 4,50-4,42 (м, 2H), 4,17 (дд, J=12,1, 8,2 Гц, 1H), 3,47 (т, J=5,1 Гц, 4H), 2,78 (дд, J=13,4, 5,9 Гц, 1H), 2,67 (дд, J=13,5, 5,9 Гц, 1H), 2,62-2,47 (м, 4H), 1,47 (с, 9H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,89, 154,83, 153,39, 150,15 (д, J<sub>CF</sub>=242,4 Гц), 149,36, 146,72, 144,02, 128,63 (д, J<sub>CF</sub>=10,3 Гц), 127,27, 125,34, 121,78, 114,34, 110,66, 108,60 (д, J<sub>CF</sub>=19,5 Гц), 106,06, 79,97, 71,76, 67,18, 58,56, 53,96, 28,57, один сигнал углерода отсутствует (возможно из-за перекрывающихся пиков);

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>BrFN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, 574,1460; обнаружено 574,1432.

(7S)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[(пиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK083S).



Смесь (S)-10 (42 мг, 0,073 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 мкл) и TFA (250 мкл) перемешивали при 23°C в течение 12 ч. Смесь разбавляли с помощью 1 М HCl (20 мл) и промывали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×7 мл). Водную фазу разбавляли с помощью 6 М NaOH (4 мл) до pH>12 и экстрагировали с помощью EtOAc (3×8 мл). Объединенные органические вещества промывали соевым раствором (8 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством ПТСХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2) обеспечивала получение



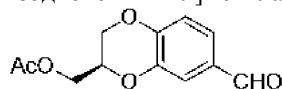
указанного в заголовке соединения JGK083S (18 мг, 52%) в виде белой рыхлой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,66 (ддд,  $J=8,2, 7,3, 1,6$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (шир. д,  $J=4,0$  Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,27 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,6$  Гц, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,5$  Гц, 1H), 4,50-4,42 (м, 2H), 4,19-4,13 (м, 1H), 2,93 (т,  $J=4,9$  Гц, 4H), 2,76 (дд,  $J=13,4, 5,9$  Гц, 1H), 2,63 (дд,  $J=13,4, 6,0$  Гц, 1H), 2,63-2,50 (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,88, 153,35, 150,12 (д,  $J_{\text{CF}}=242,3$  Гц), 149,45, 146,71, 144,17, 128,67 (д,  $J_{\text{CF}}=10,4$  Гц), 127,21, 125,32 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 121,74, 114,30, 110,64, 108,58 (д,  $J_{\text{CF}}=19,3$  Гц), 106,02, 71,70, 67,32, 59,19, 55,54, 46,23;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M} - \text{H}]^-$  расщ. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrFN}_5\text{O}_2^-$ , 472,0790; обнаружено 472,0773.

[(2R)-7-Формил-2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]ацетат ((R)-10).



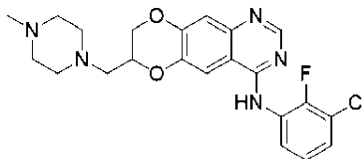
Смесь 1 (150 мг, 0,833 ммоль) и (2R)-глицидилтозилата (203 мг, 0,891 ммоль) в DMF (2 мл) обрабатывали с помощью  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (181 мг, 1,31 ммоль) и смесь перемешивали при  $60^\circ\text{C}$  в течение 15 ч. Смесь охлаждали до  $23^\circ\text{C}$ , воду (30 мл) добавляли и смесь экстрагировали с помощью EtOAc ( $3 \times 15$  мл). Объединенные органические вещества промывали водой (15 мл), соевым раствором (15 мл), сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фильтровали и выпаривали. Очистка посредством препаративной тонкослойной хроматографии (гексаны/EtOAc 7:3) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (R)-10 (111 мг, 56%) в виде прозрачного бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,82 (с, 1H), 7,44 (д,  $J=1,8$  Гц, 1H), 7,42 (дд,  $J=8,2, 1,9$  Гц, 1H), 7,00 (д,  $J=8,1$  Гц, 1H), 4,46-4,39 (м, 1H), 4,37 (дд,  $J=11,5, 2,4$  Гц, 1H), 4,35 (дд,  $J=11,7, 4,9$  Гц, 1H), 4,31 (дд,  $J=11,9, 5,1$  Гц, 1H), 4,13 (дд,  $J=11,5, 7,1$  Гц, 1H), 2,11 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  190,72, 170,67, 148,57, 143,22, 131,15, 124,38, 118,76, 117,85, 70,94, 65,54, 62,36, 20,83;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_5^+$ , 237,0757; обнаружено 237,0745.

( $\pm$ )-N-(3-Хлор-2-фторфенил)-7-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK075).

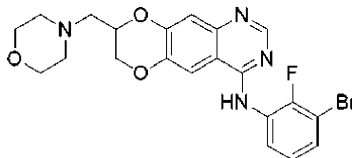


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (с, 1H), 8,61 (тд,  $J=7,3, 2,2$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,35 (уш д,  $J=3,4$  Гц, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,16 (тд,  $J=8,1, 1,2$  Гц, 1H), 7,13 (тд,  $J=8,2, 1,9$  Гц, 1H), 4,49-4,41 (м, 2H), 4,15 (дд,  $J=11,8, 8,1$  Гц, 1H), 2,78 (дд,  $J=13,4, 5,9$  Гц, 1H), 2,66 (дд,  $J=13,4, 5,9$  Гц, 1H), 2,64 (уш, 4H), 2,48 (уш, 4H), 2,31 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,89, 153,35, 149,44, 149,30 (д,  $J_{\text{CF}}=244,2$  Гц), 146,72, 144,15, 128,76 (д,  $J_{\text{CF}}=9,3$  Гц), 124,71 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 124,45, 121,01, 120,85 (д,  $J_{\text{CF}}=16,1$  Гц), 114,30, 110,63, 106,05, 71,81, 67,31, 58,50, 55,17, 54,15, 46,19;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClFN}_5\text{O}_2^+$ , 444,1597; обнаружено 444,1582.

( $\pm$ )-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(морфолин-4-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK076).

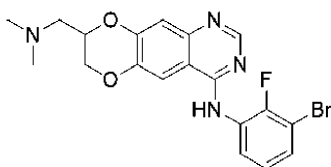


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,2, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,5, 7,1, 1,6$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,1, 1,2$  Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,63-4,56 (м, 1H), 4,46 (дд,  $J=11,6, 2,5$  Гц, 1H), 4,17 (дд,  $J=11,6, 7,1$  Гц, 1H), 3,59 (т,  $J=4,6$  Гц, 4H), 2,71-2,59 (м, 2H), 2,57-2,44 (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  157,22, 153,37 (д,  $J_{\text{CF}}=247,3$  Гц), 153,13, 148,75, 146,16, 143,28, 130,14, 128,02 (д,  $J_{\text{CF}}=13,0$  Гц), 127,74, 125,45 (д,  $J_{\text{CF}}=4,7$  Гц), 112,57, 109,61, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,9$  Гц), 108,23, 71,41, 66,29, 66,18, 57,97, 53,89;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M} - \text{H}]^-$  расщ. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrFN}_4\text{O}_3^-$ , 473,0630; обнаружено 473,0608.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(диметиламино)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK077).

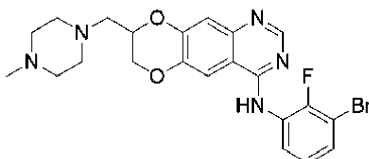


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,2, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,5, 7,1, 1,6$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,1, 1,2$  Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,57-4,51 (м, 1H), 4,44 (дд,  $J=11,6, 2,5$  Гц, 1H), 4,14 (дд,  $J=11,7, 7,1$  Гц, 1H), 2,58 (с, 1H), 2,57 (с, 1H), 2,25 (с, 6H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,22, 153,38 (д,  $J_{\text{CF}}=247,4$  Гц), 153,12, 148,78, 146,16, 143,29, 130,14, 128,02 (д,  $J_{\text{CF}}=13,1$  Гц), 127,75, 125,45 (д,  $J_{\text{CF}}=4,4$  Гц), 112,54, 109,59, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 108,20, 71,76, 66,31, 58,73, 45,92;

МСВР (DART):  $m/z$  [M-H] $^-$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$ , 431,0524; обнаружено 431,0503.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK078).

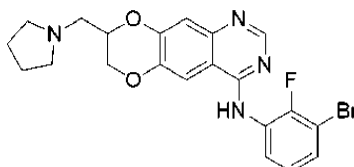


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,2, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,5, 7,1, 1,6$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,1, 1,2$  Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,60-4,53 (м, 1H), 4,44 (дд,  $J=11,6, 2,5$  Гц, 1H), 4,14 (дд,  $J=11,7, 7,1$  Гц, 1H), 2,68-2,59 (м, 2H), 2,53 (уш, 4H), 2,34 (уш, 4H), 2,16 (с, 3H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,22, 153,38 (д,  $J_{\text{CF}}=247,4$  Гц), 153,12, 148,78, 146,15, 143,29, 130,13, 128,02 (д,  $J_{\text{CF}}=13,1$  Гц), 127,74, 125,45 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 112,55, 109,60, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 108,22, 71,57, 66,34, 57,52, 54,68, 53,29, 45,72;

МСВР (DART):  $m/z$  [M-H] $^-$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BrFN}_5\text{O}_2^-$ , 486,0946; обнаружено 486,0928.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(пирролидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK079).

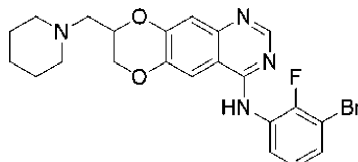


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,3, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,5, 7,1, 1,6$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,0, 1,2$  Гц, 1H), 7,19 (с, 1H), 4,57-4,49 (м, 1H), 4,46 (дд,  $J=11,6, 2,5$  Гц, 1H), 4,16 (дд,  $J=11,6, 7,1$  Гц, 1H), 2,80 (дд,  $J=12,8, 6,0$  Гц, 1H), 2,73 (дд,  $J=12,8, 6,2$  Гц, 1H), 2,62-2,48 (м, 4H), 1,74-1,66 (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,22, 153,37 (д,  $J_{\text{CF}}=247,5$  Гц), 153,12, 148,79, 146,17, 143,29, 130,13, 128,02 (д,  $J_{\text{CF}}=12,9$  Гц), 127,74, 125,45 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 112,54, 109,58, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=20,0$  Гц), 108,19, 72,65, 66,32, 55,42, 54,31, 23,23;

МСВР (DART):  $m/z$  [M-H] $^-$  расщ. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$ , 457,0681; обнаружено 457,0660.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[(пиперидин-1-ил)метил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK080).

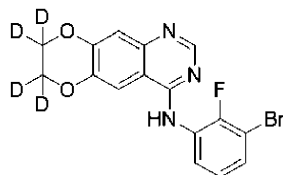


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,59 (ддд,  $J=8,0, 6,3, 1,6$  Гц, 1H), 7,54 (ддд,  $J=8,4, 7,0, 1,6$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,1, 1,2$  Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 4,59-4,52 (м, 1H), 4,44 (дд,  $J=11,6, 2,5$  Гц, 1H), 4,14 (дд,  $J=11,7, 7,1$  Гц, 1H), 2,65-2,54 (м, 2H), 2,53-2,37 (м, 4H), 1,55-1,47 (м, 4H), 1,43-1,34 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,21, 153,37 (д,  $J_{\text{CF}}=247,1$  Гц), 153,11, 148,83, 146,15, 143,32, 130,12, 128,03 (д,  $J_{\text{CF}}=13,1$  Гц), 127,73, 125,45 (д,  $J_{\text{CF}}=4,5$  Гц), 112,53, 109,57, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 108,19, 71,63, 66,42, 58,35, 54,74, 25,61, 23,83;

МСВР (DART):  $m/z$  [M-H] $^-$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$ , 471,0837; обнаружено 471,0814.

N-(3-Бром-2-фторфенил)(7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK081).

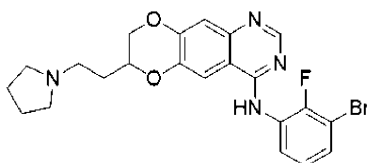


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (ддд, J=7,9, 6,3, 1,6 Гц, 1H), 7,54 (ддд, J=8,4, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 7,19 (с, 1H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,19, 153,37 (д, J<sub>CF</sub>=247,2 Гц), 153,10, 149,27, 146,03, 143,67, 130,12, 128,03 (д, J<sub>CF</sub>=13,0 Гц), 127,74, 125,44 (д, J<sub>CF</sub>=4,2 Гц), 112,47, 109,63, 108,55 (д, J<sub>CF</sub>=19,9 Гц), 108,35;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>D<sub>4</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 380,0342; обнаружено 380,0327.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(пирролидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK084).

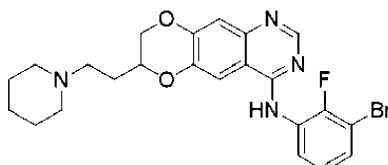


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,60 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,4, 7,0, 1,6 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,1 Гц, 2H), 7,20 (с, 1H), 4,50 (дд, J=11,5, 2,3 Гц, 1H), 4,42-4,36 (м, 1H), 4,12 (дд, J=11,5, 7,7 Гц, 1H), 2,70-2,56 (м, 2H), 2,49-2,40 (м, 4H), 1,89-1,78 (м, 2H), 1,73-1,64 (м, 4H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,21, 153,33 (д, J<sub>CF</sub>=247,5 Гц), 153,13, 148,95, 146,02, 143,37, 130,08, 128,07 (д, J<sub>CF</sub>=13,1 Гц), 127,64, 125,48 (д, J<sub>CF</sub>=4,6 Гц), 112,26, 109,78, 108,58 (д, J<sub>CF</sub>=19,8 Гц), 108,44, 71,76, 67,78, 53,63, 51,03, 29,53, 23,16;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>BrFN<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 473,0983; обнаружено 473,0976.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-7-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK085).

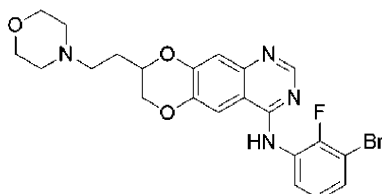


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,60 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,2, 1,6 Гц, 1H), 7,53 (ддд, J=8,4, 7,1, 1,6 Гц, 1H), 7,204 (тд, J=8,2, 1,3 Гц, 1H), 7,198 (с, 1H), 4,51 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,39-4,33 (м, 1H), 4,11 (дд, J=11,6, 7,8 Гц, 1H), 2,50-2,44 (м, 2H), 2,42-2,27 (м, 4H), 1,90-1,76 (м, 2H), 1,55-1,45 (м, 4H), 1,42-1,34 (м, 2H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,20, 153,33 (д, J<sub>CF</sub>=247,4 Гц), 153,12, 148,95, 146,02, 143,39, 130,08, 128,07 (д, J<sub>CF</sub>=13,1 Гц), 127,64, 125,48 (д, J<sub>CF</sub>=4,5 Гц), 112,25, 109,77, 108,58 (д, J<sub>CF</sub>=20,0 Гц), 108,43, 71,97, 67,80, 54,08, 53,96, 27,69, 25,61, 24,12;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. Для C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>BrFN<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 487,1139; обнаружено 487,1137.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(морфолин-4-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK086).

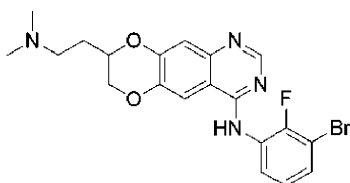


<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,63 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,58 (ддд, J=8,0, 6,3, 1,5 Гц, 1H), 7,53 (т, J=7,0 Гц, 1H), 7,21 (тд, J=8,1, 1,2 Гц, 1H), 4,50 (дд, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 4,47-4,40 (м, 1H), 4,10 (дд, J=11,6, 7,4 Гц, 1H), 3,58 (т, J=4,7 Гц, 4H), 2,55-2,46 (м, 2H), 2,45-2,33 (м, 4H), 1,92-1,79 (м, 2H);

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,20, 153,33 (д, J<sub>CF</sub>=248,3 Гц), 153,06, 148,94, 146,06, 143,26, 130,03, 128,12 (д, J<sub>CF</sub>=9,8 Гц), 127,69, 125,44 (д, J<sub>CF</sub>=4,4 Гц), 112,47, 109,64, 108,55 (д, J<sub>CF</sub>=19,9 Гц), 108,18, 72,30, 67,35, 66,22, 53,53, 53,28, 27,25;

МСВР (DART): m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>BrFN<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 489,0932; обнаружено 489,0926.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(диметиламино)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK087).

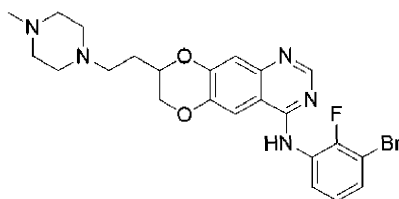


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,61 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т,  $J=6,9$  Гц, 1H), 7,54 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,21 (т,  $J=8,1$  Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 4,49 (дд,  $J=11,6, 2,3$  Гц, ш), 4,45-4,38 (м, 1H), 4,09 (дд,  $J=11,6, 7,5$  Гц, 1H), 2,47-2,38 (м, 2H), 2,17 (с, 6H), 1,86-1,78 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,20, 153,37 (д,  $J_{\text{CF}}=247,6$  Гц), 153,08, 148,99, 146,14, 143,29, 130,10, 128,07 (д,  $J_{\text{CF}}=15,6$  Гц), 127,72, 125,44 (д,  $J_{\text{CF}}=4,4$  Гц), 112,50, 109,58, 108,54 (д,  $J_{\text{CF}}=19,7$  Гц), 108,13, 72,30, 67,36, 54,43, 45,17, 28,27;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$ , 447,0826; обнаружено 447,0818.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK088).

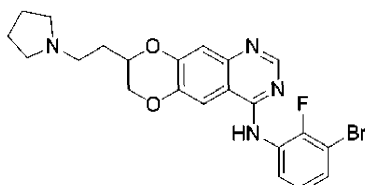


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,54 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,21 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд,  $J=1,5, 2,4$  Гц, ш), 4,45-4,38 (м, 1H), 4,10 (дд,  $J=11,6, 7,4$  Гц, 1H), 2,48-2,21 (м, 10H), 2,14 (с, 3H), 1,91-1,76 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,20, 153,36 (д,  $J_{\text{CF}}=246,9$  Гц), 153,08, 148,98, 146,13, 143,28, 130,09, 128,05 (д,  $J_{\text{CF}}=11,7$  Гц), 127,72, 125,44 (д,  $J_{\text{CF}}=4,3$  Гц), 112,50, 109,58, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 108,13, 72,40, 67,37, 54,78, 53,11, 52,65, 45,76, 27,61;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BrFN}_5\text{O}_2^+$ , 502,1248; обнаружено 502,1240.

(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(пирролидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK089).

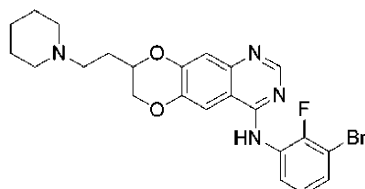


$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т,  $J=7,2$  Гц, 1H), 7,53 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,21 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд,  $J=11,5, 2,4$  Гц, ш), 4,47-4,41 (м, 1H), 4,10 (дд,  $J=11,5, 7,4$  Гц, 1H), 2,68-2,53 (м, 2H), 2,50-2,40 (м, 4H), 1,89-1,81 (м, 2H), 1,73-1,65 (м, 4H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,20, 153,36 (д,  $J_{\text{CF}}=246,9$  Гц), 153,07, 148,98, 146,13, 143,28, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (д,  $J_{\text{CF}}=4,6$  Гц), 112,48, 109,60, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,8$  Гц), 108,15, 72,31, 67,37, 53,57, 50,97, 29,58, 23,14;

МСВР (DART):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$ , 473,0983; обнаружено 473,0976.

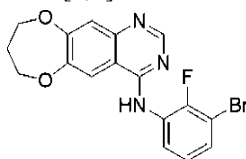
(±)-N-(3-Бром-2-фторфенил)-8-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-7,8-дигидро[1,4]диоксино[2,3-g]хиназолин-4-амин (JGK090).



$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,62 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,59 (т,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,53 (т,  $J=7,5$  Гц, 1H), 7,21 (тд,  $J=8,0, 1,2$  Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,49 (дд,  $J=11,5, 2,4$  Гц, 1H), 4,44-4,37 (м, 1H), 4,10 (дд,  $J=11,6, 7,4$  Гц, 1H), 2,48-2,43 (м, 2H), 2,41-2,27 (м, 4H), 1,90-1,77 (м, 2H), 1,54-1,45 (м, 4H), 1,42-1,34 (м, 2H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157,19, 153,34 (д,  $J_{\text{CF}}=246,7$  Гц), 153,07, 149,00, 146,11, 143,29, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (д,  $J_{\text{CF}}=4,3$  Гц), 112,48, 109,60, 108,55 (д,  $J_{\text{CF}}=19,9$  Гц), 108,14, 72,50, 67,40, 54,02, 53,87, 27,70, 25,63, 24,13;

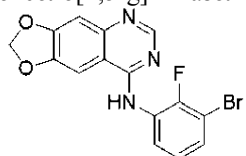
МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{23}H_{25}BrFN_4O_2^+$ , 487,1139; обнаружено 487,1133.  
N-(3-Бром-2-фторфенил)-8,9-дигидро-7Н-[1,4]диоксепино[2,3-*g*]хиназолин-4-амин (JGK091).



$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,71 (с, 1H), 8,65 (ддд,  $J=8,3, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,48 (с, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,39 (уш, 1H), 7,28 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,5$  Гц, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 4,41 (т,  $J=5,7$  Гц, 1H), 4,38 (т,  $J=5,8$  Гц, 1H), 2,32 (р,  $J=5,8$  Гц, 1H);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  157,06, 156,08, 153,93, 151,62, 150,19 (д,  $J_{CF}=242,7$  Гц), 147,83, 128,53 (д,  $J_{CF}=10,4$  Гц), 127,39, 125,32 (д,  $J_{CF}=4,7$  Гц), 121,84, 119,15, 111,47, 110,85, 108,62 (д,  $J_{CF}=19,3$  Гц), 70,86, 70,51, 31,03;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{17}H_{14}BrFN_3O_2^+$ , 390,0248; обнаружено 390,0236.  
N-(3-Бром-2-фторфенил)-2Н-[1,3]диоксол[4,5-*g*]хиназолин-8-амин (JGK092).



$^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,69 (с, 1H), 8,58 (ддд,  $J=8,3, 7,3, 1,5$  Гц, 1H), 7,28 (ддд,  $J=8,1, 6,5, 1,6$  Гц, 1H), 7,25 (шир., 1H), 7,14 (с, 1H), 7,11 (тд,  $J=8,2, 1,6$  Гц, 1H), 6,17 (с, 2H), сигнал одного протона отсутствует (возможно скрыт сигналом хлороформа);

$^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  156,10, 153,37, 153,22, 150,22 (д,  $J_{CF}=242,3$  Гц), 149,37, 148,43, 128,67 (д,  $J_{CF}=10,4$  Гц), 127,28, 125,30 (д,  $J_{CF}=4,7$  Гц), 121,84, 110,75, 108,64 (д,  $J_{CF}=19,4$  Гц), 106,29, 102,48, 96,49;

МСВР (DART):  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ. для  $C_{15}H_{10}BrFN_3O_2^+$ , 361,9935; обнаружено 361,9925.

Пример 19. Исследования метаболизма иллюстративных соединений серии JGK.

Иллюстративные соединения (10 мМ) инкубировали в микросомах печени человека, собаки, мыши или крысы (1 мг/мл) в течение до 90 мин при 37°C. Реакции останавливали добавлением ацетонитрила. Параллельно проводили контрольные (не содержащие соединения) исследования микросом. ЖХМС-исследования проводили на приборе Waters Xevo G2 QToF, оборудованном колонкой Luna Omega Polar C18, 1,6 м, 2,1×30 мм. Структуры иллюстративных метаболитов изображены на фиг. 47.

Модификация	Человек (%)	Собака (%)	Мышь (%)	Крыса (%)
1. Исходный	<b>67,0</b>	3,5	59,9	70,2
2. Гидроксилирование	6,0	0,0	0,0	4,8
3. N-деметилирование	13,7	0,9	5,4	8,2
4. Гидроксилирование	4,2	61,9	22,0	21,9
5. Гидроксилирование	0,7	0,0	0,0	0,6
6. N-деалкилирование	6,5	0,0	1,3	2,7

Включение посредством ссылки.

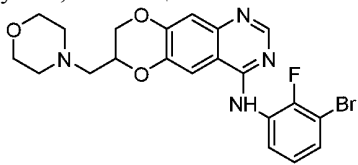
Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, тем самым включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения в качестве ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты.

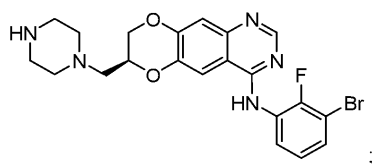
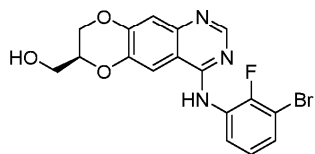
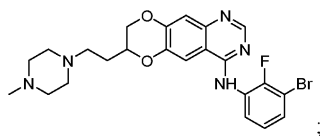
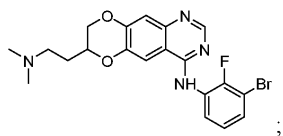
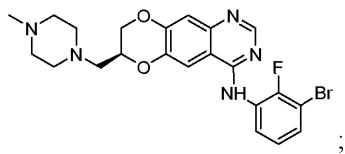
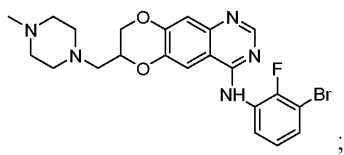
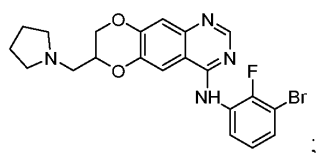
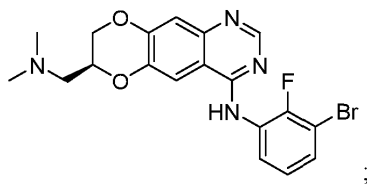
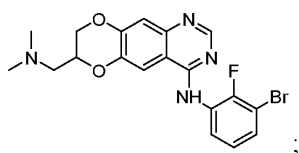
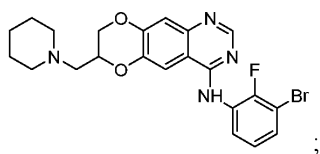
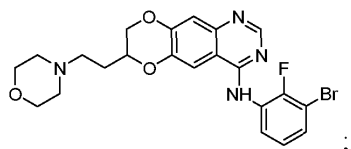
Хотя обсуждались конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Многие варианты изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с настоящим описанием и приведенной ниже формулой изобретения. Полный объем изобретения должен определяться ссылкой на формулу изобретения вместе с полным объемом их эквивалентов и описанием вместе с такими вариациями.

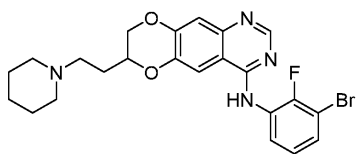
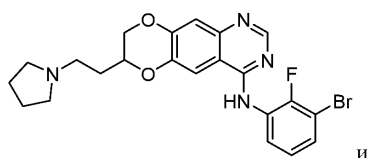
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из группы, состоящей из



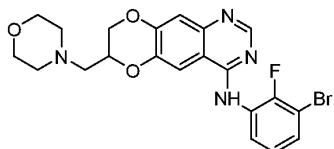
044668



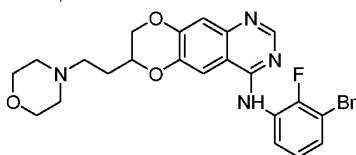


или его фармацевтически приемлемая соль.

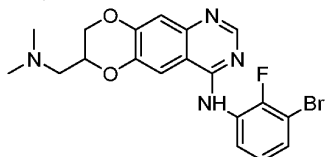
2. Соединение по п.1, представляющее собой



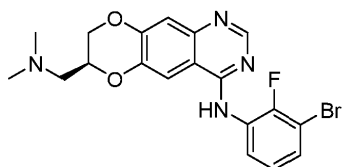
3. Соединение по п.1, представляющее собой



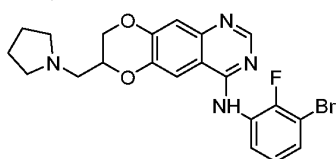
4. Соединение по п.1, представляющее собой



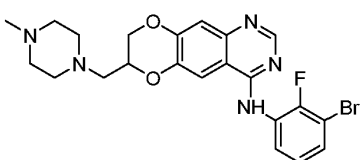
5. Соединение по п.1, представляющее собой



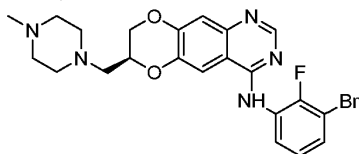
6. Соединение по п.1, представляющее собой



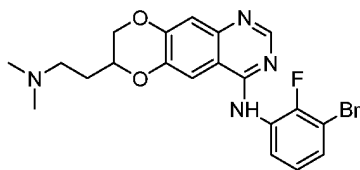
7. Соединение по п.1, представляющее собой



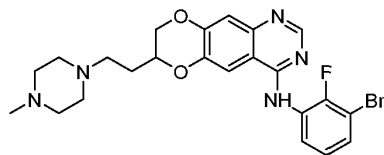
8. Соединение по п.1, представляющее собой



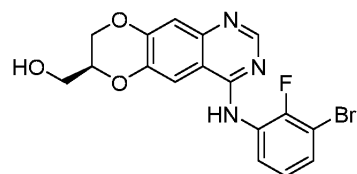
9. Соединение по п.1, представляющее собой



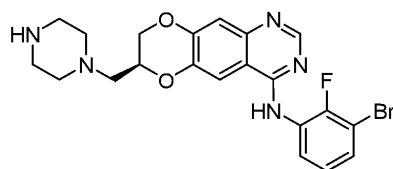
10. Соединение по п.1, представляющее собой



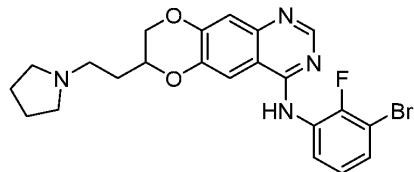
11. Соединение по п.1, представляющее собой



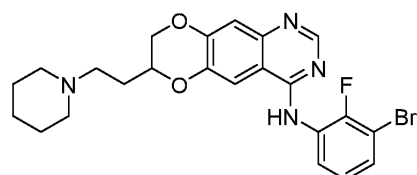
12. Соединение по п.1, представляющее собой



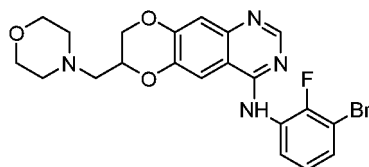
13. Соединение по п.1, представляющее собой



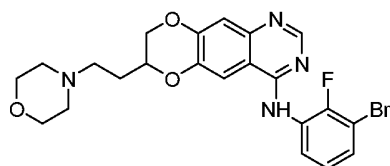
14. Соединение по п.1, представляющее собой



15. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:

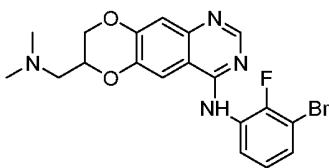


16. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:

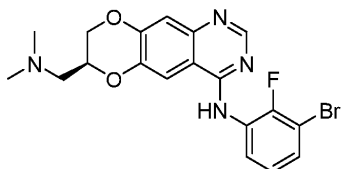




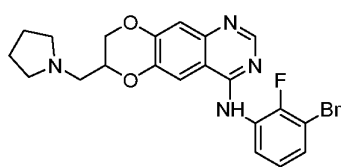
17. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



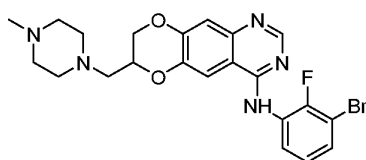
18. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



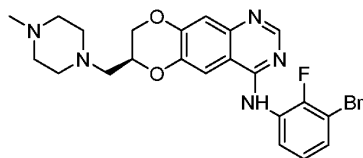
19. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



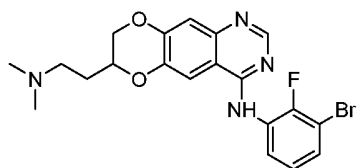
20. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



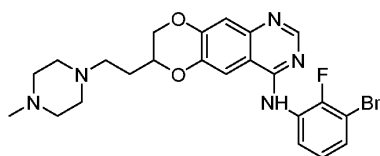
21. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



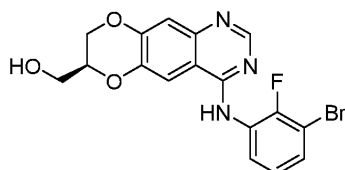
22. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



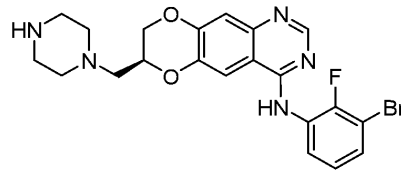
23. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



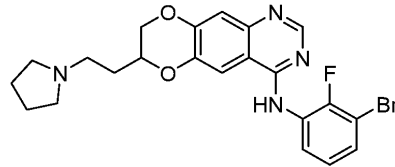
24. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



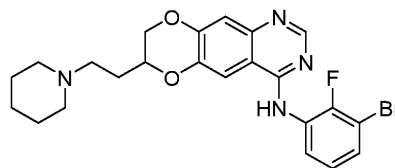
25. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:



26. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:

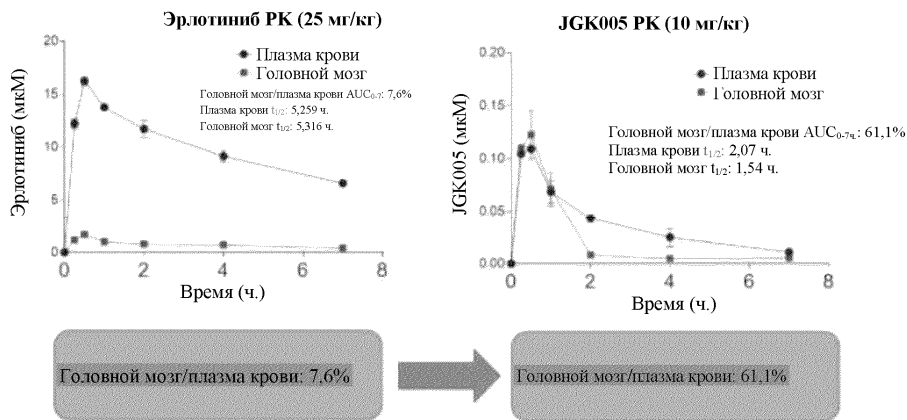


27. Соединение по п.1, представляющее собой фармацевтически приемлемую соль следующего соединения:

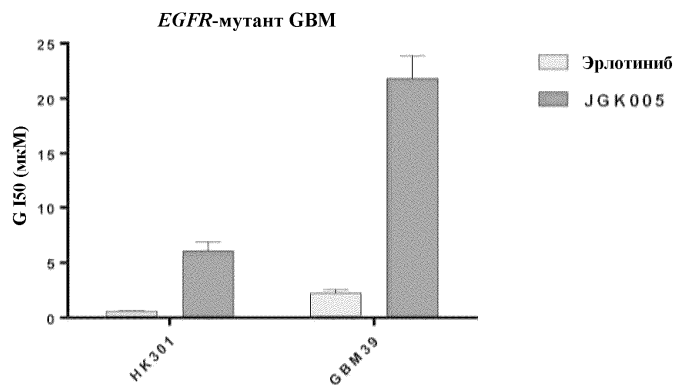


28. Фармацевтическая композиция, включающая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Способ лечения рака, который можно лечить ингибированием EGFR, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения, или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, или фармацевтической композиции, включающей соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

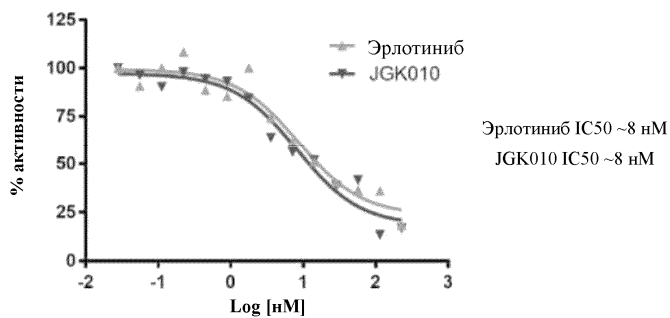


Фиг. 1



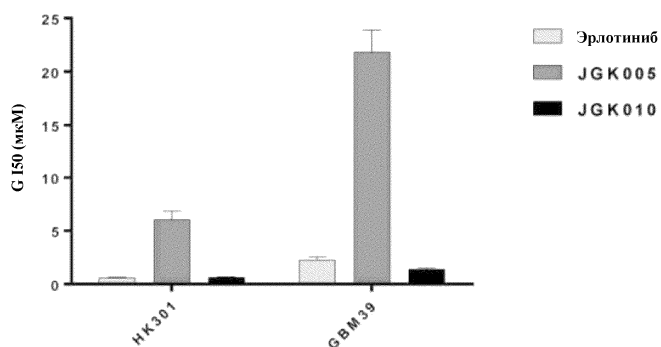
Фиг. 2

Активность бесклеточной киназы EGFR

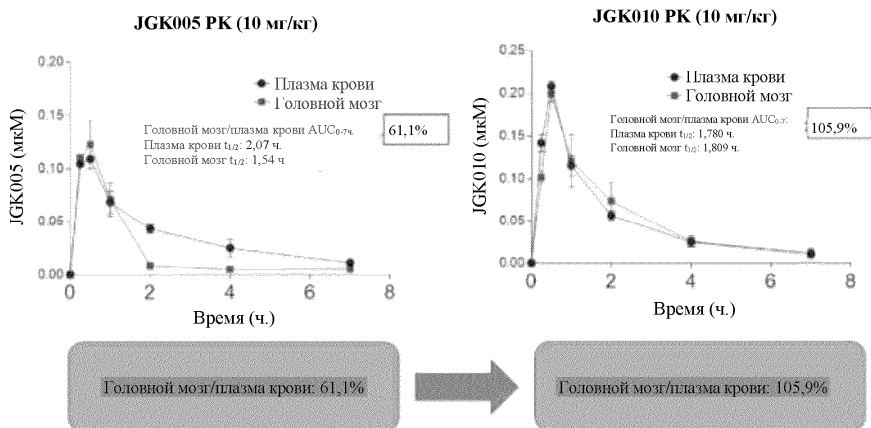


Фиг. 3

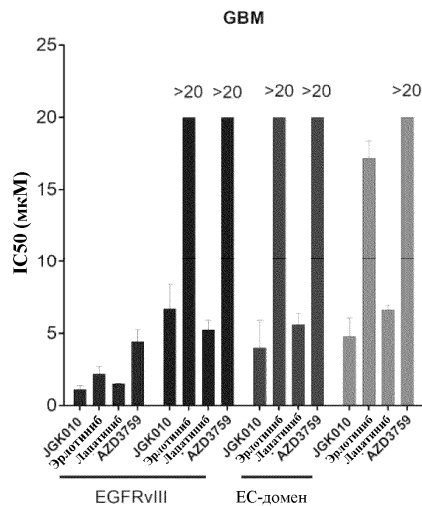
EGFR-мутант GBM



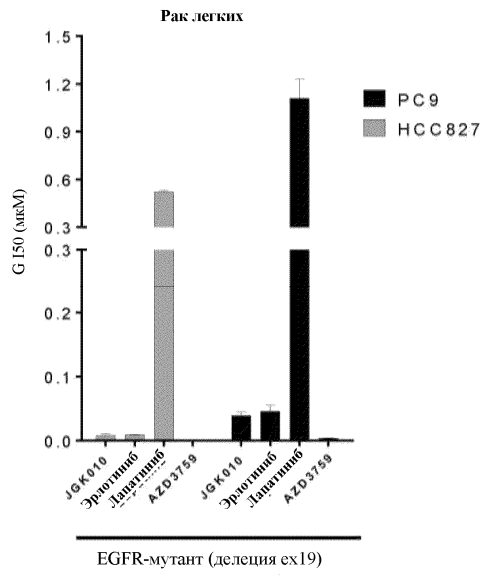
Фиг. 4



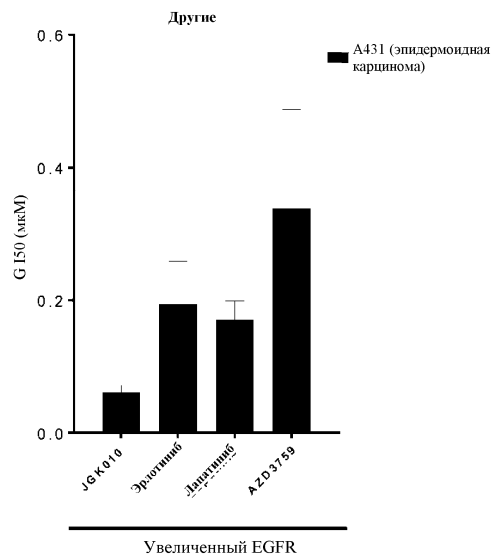
Фиг. 5



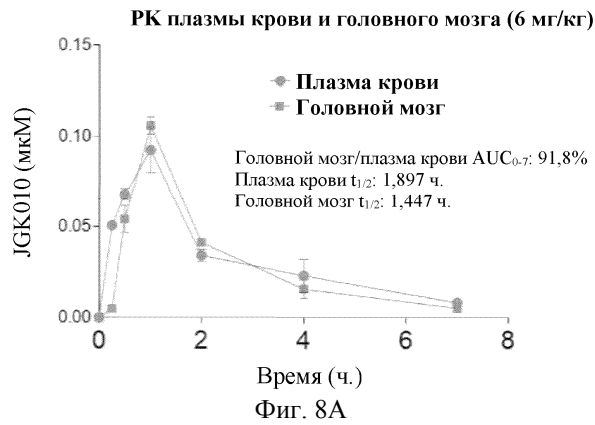
Фиг. 6



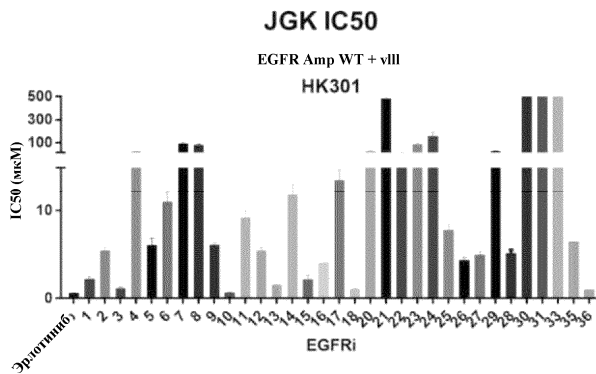
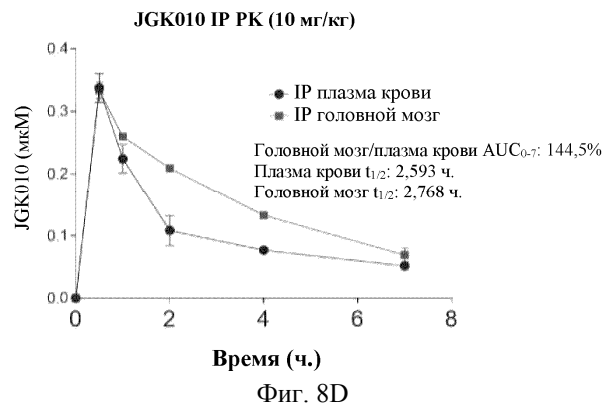
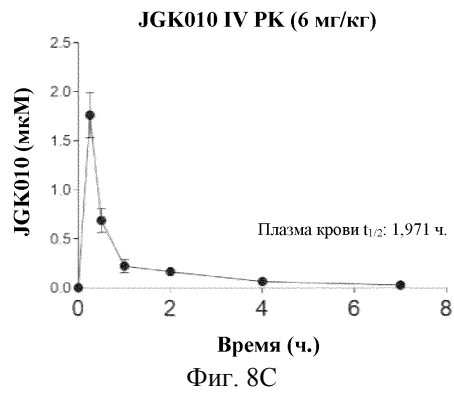
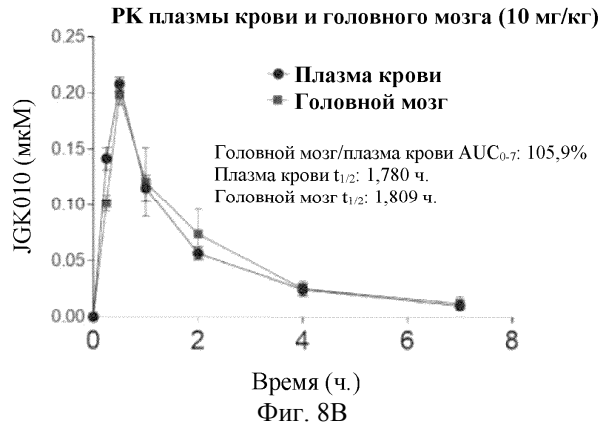
Фиг. 7А

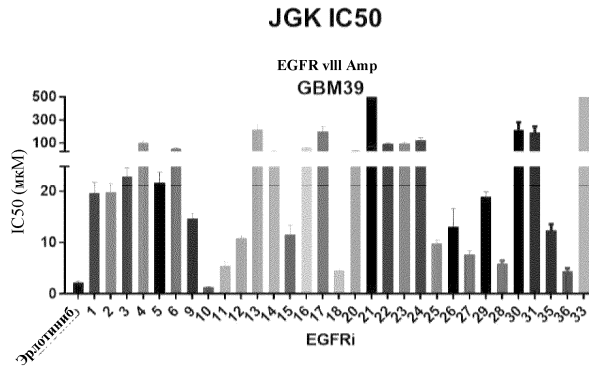


Фиг. 7В

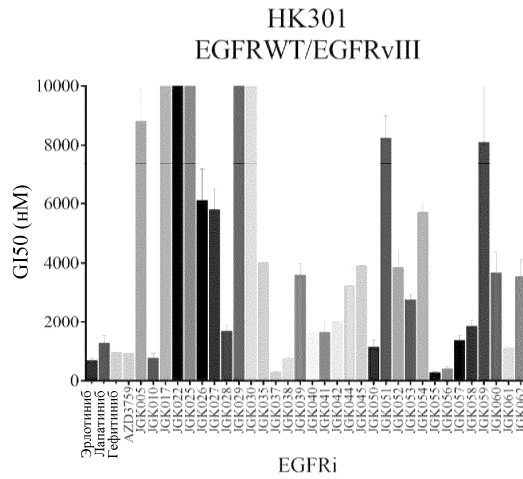


Фиг. 8А

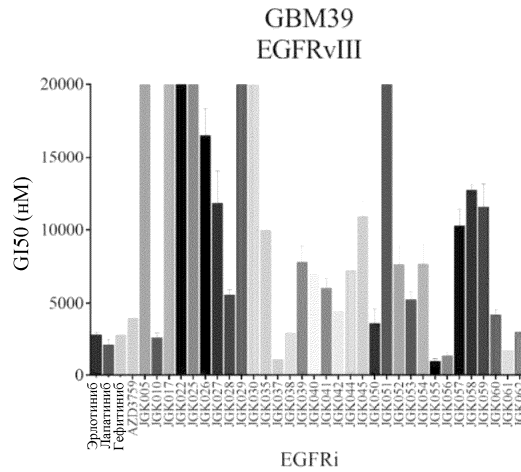




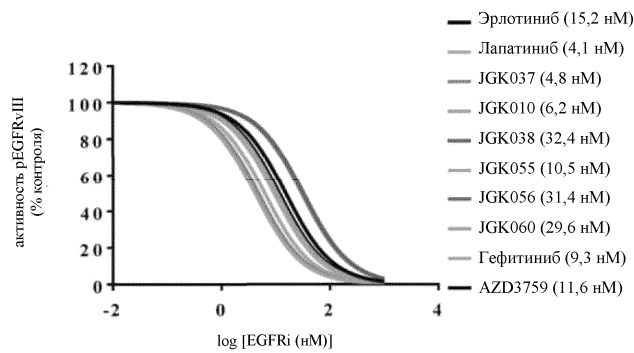
Фиг. 10



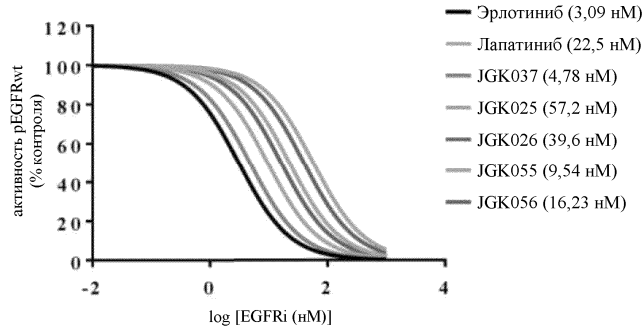
Фиг. 11



Фиг. 12

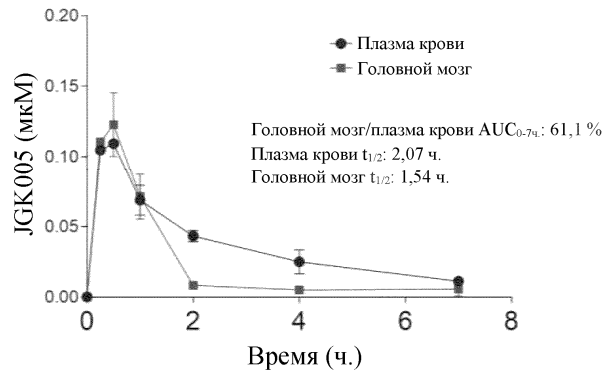


Фиг. 13А



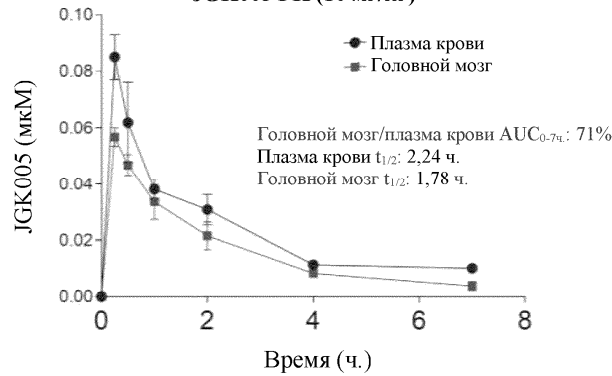
Фиг. 13В

**JGK005 РК (10 мг/кг)**



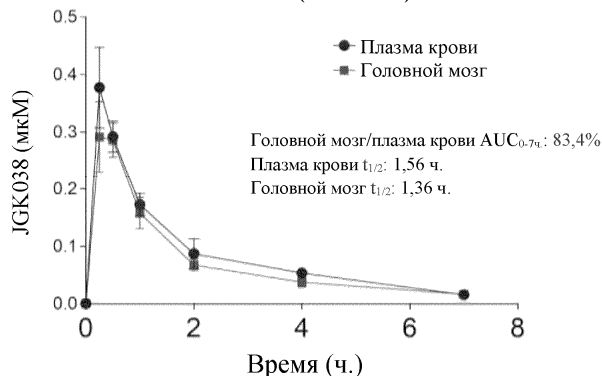
Фиг. 14А

**JGK005 РК (10 мг/кг)**

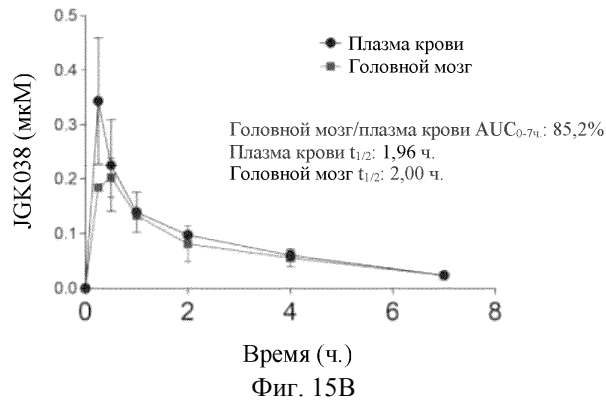
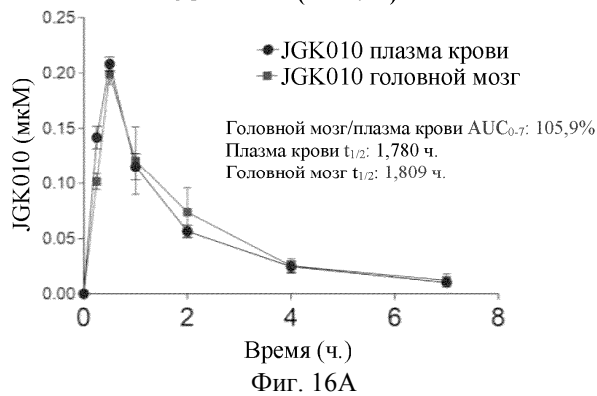
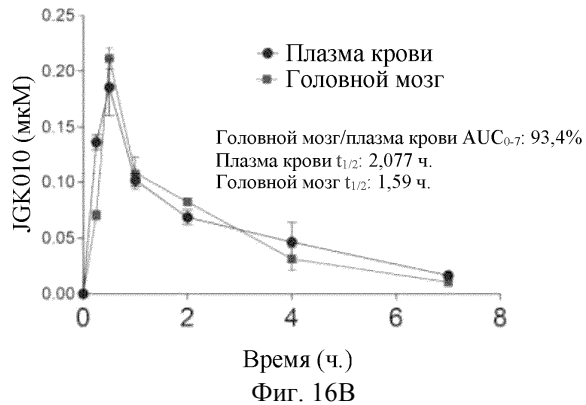
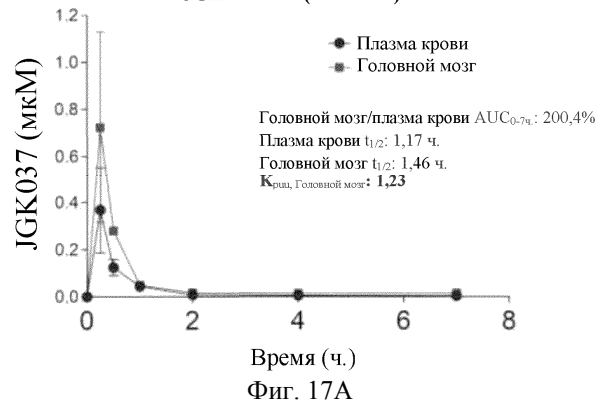


Фиг. 14В

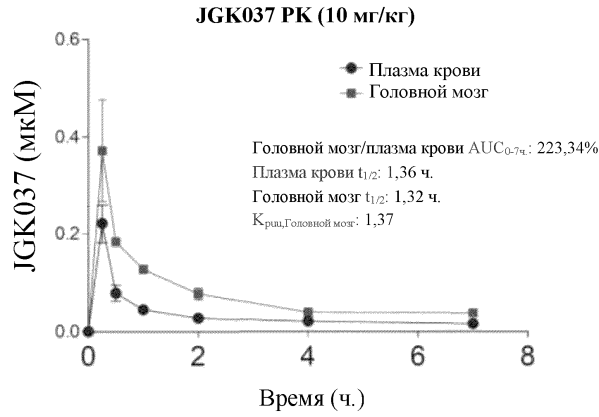
**JGK038 РК (10 мг/кг)**



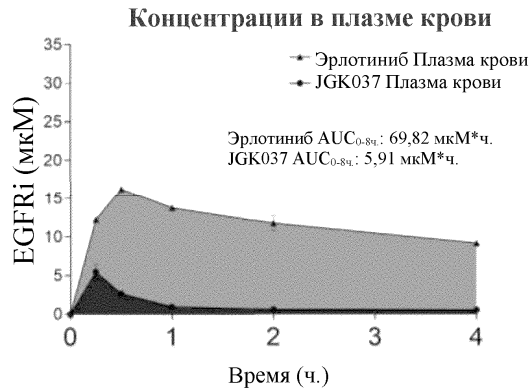
Фиг. 15А

**JGK038 РК (10 мг/кг)****JGK010 РК (10 мг/кг)****РК плазмы крови и головного мозга (10 мг/кг)****JGK037 РК (10 мг/кг)**

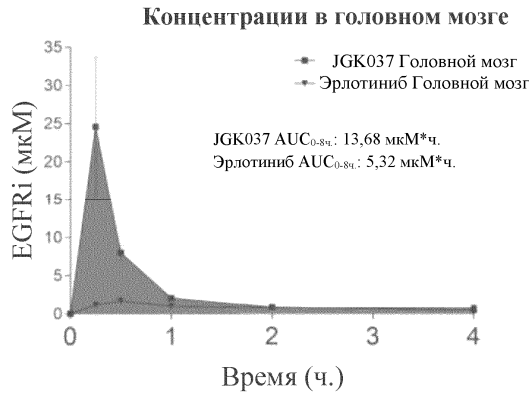




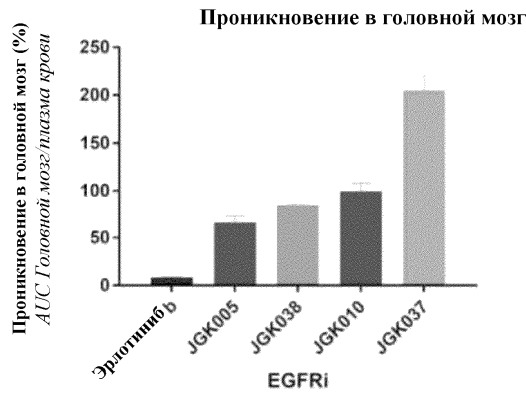
Фиг. 17В



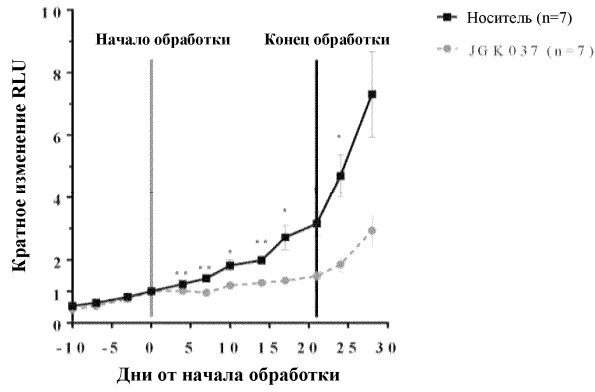
Фиг. 18А



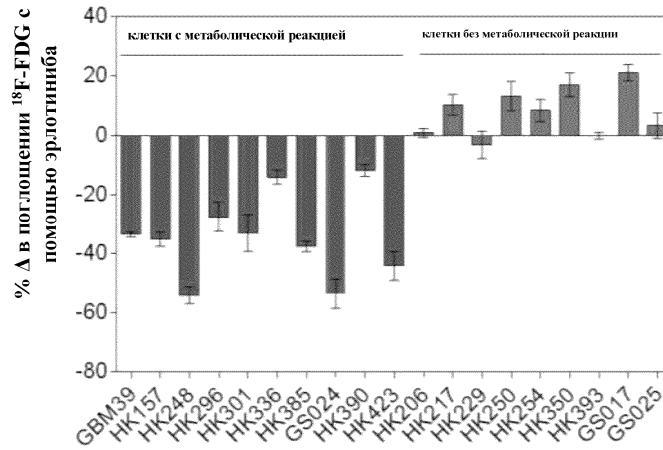
Фиг. 18В



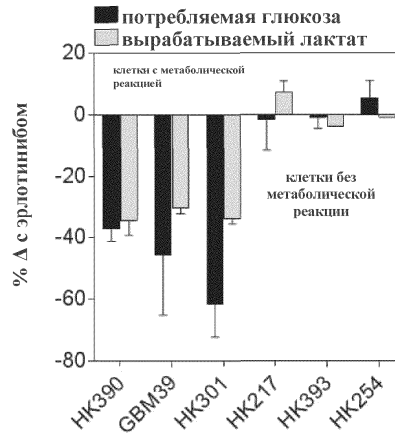
Фиг. 19



Фиг. 20

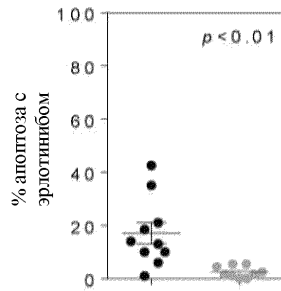


Фиг. 21А

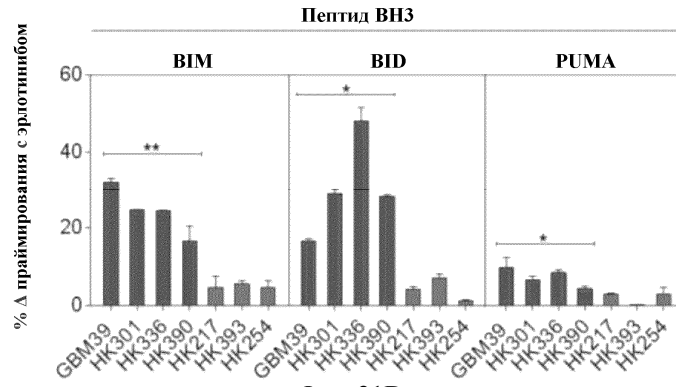


Фиг. 21В

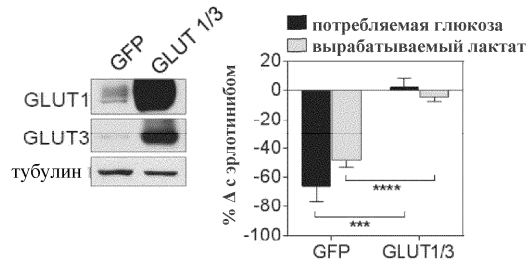
- клетки с метаболической реакцией (n=10)
- клетки без метаболической реакции (n = 9)



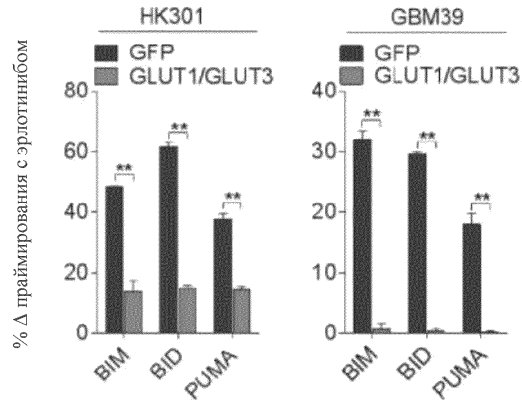
Фиг. 21С



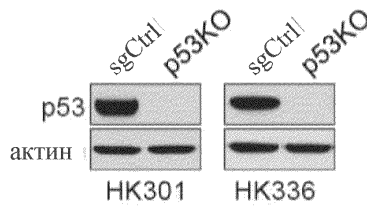
Фиг. 21D



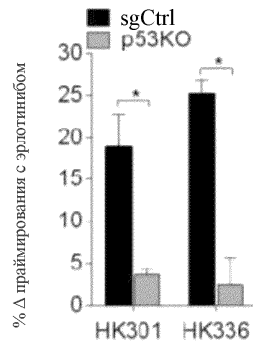
Фиг. 21E



Фиг. 21F

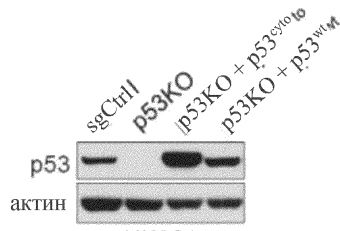


Фиг. 22A

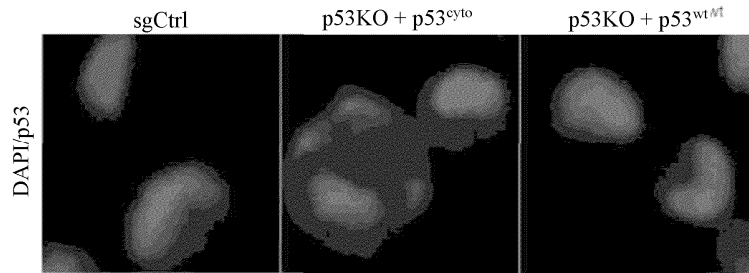


Фиг. 22B

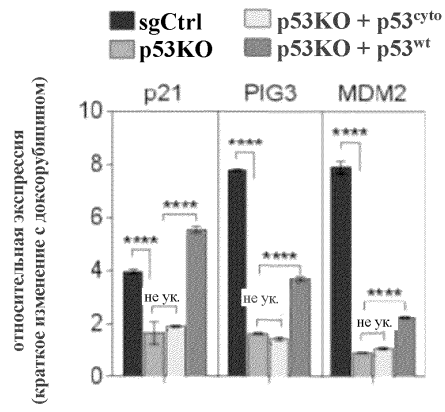
044668



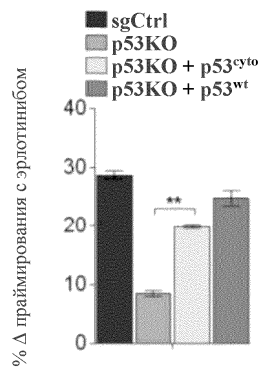
НК301  
Фиг. 22С



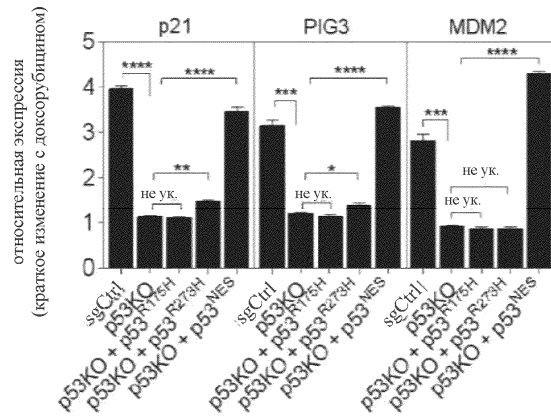
Фиг. 22D



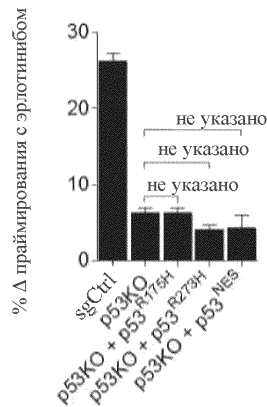
Фиг. 22Е



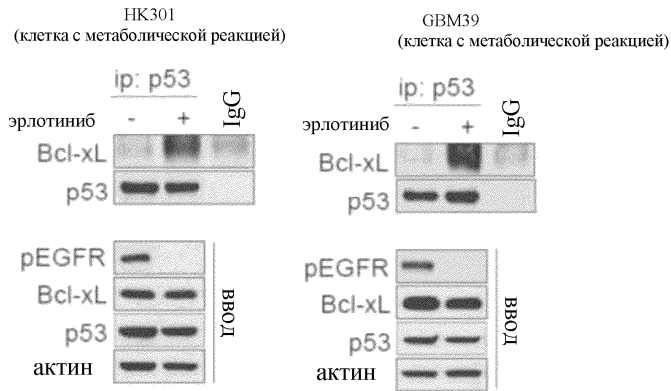
Фиг. 22F



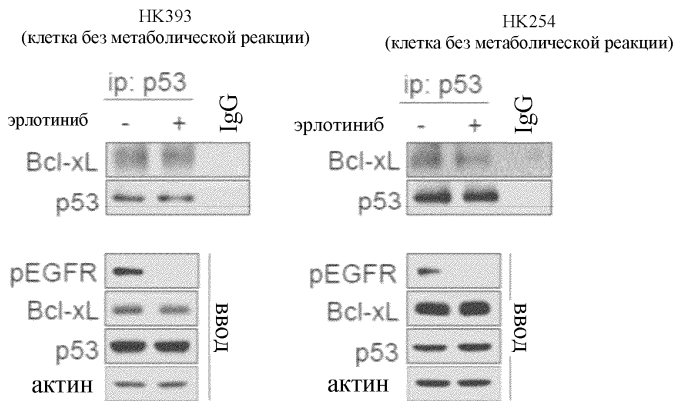
Фиг. 22G



Фиг. 22H



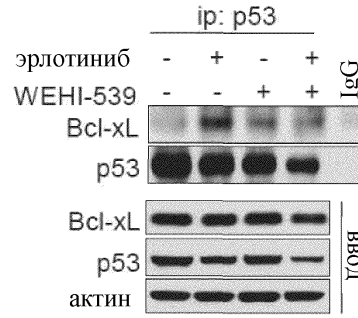
Фиг. 23А



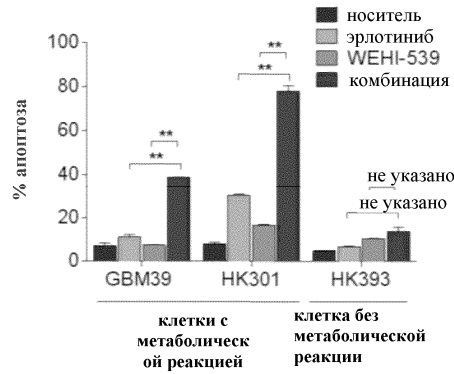
Фиг. 23В



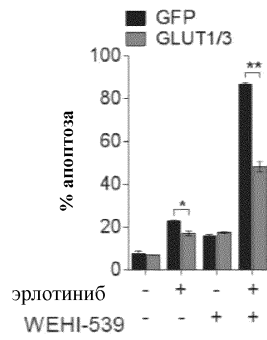
Фиг. 23С



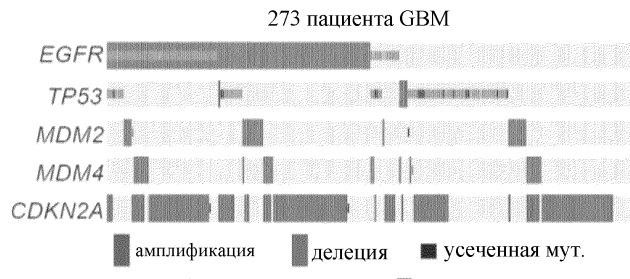
Фиг. 23D



Фиг. 23Е



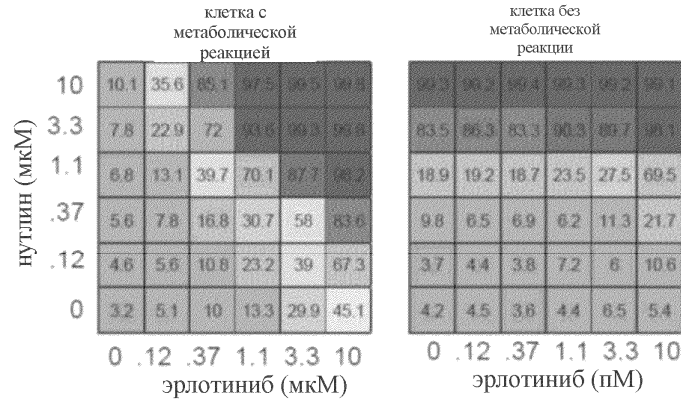
Фиг. 23F



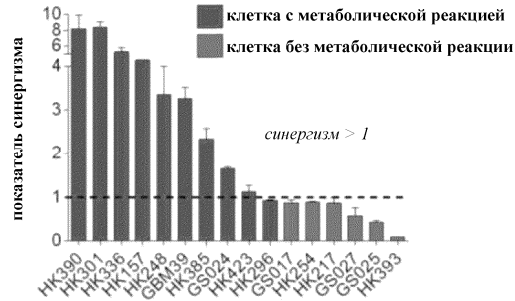
Фиг. 24А

ГЕН А	ГЕН В	P-ЗНАЧЕНИЕ	ЛОГАРИФМ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ	СВЯЗЫВАНИЕ
EGFR	TP53	<0,001	-1,383	Мут. Искл.
MDM2	TP53	<0,001	-2,547	Мут. Искл.
CDKN2A	TP53	<0,001	-1,403	Мут. Искл.
EGFR	CDKN2A	0,004	,703	Совместная встречаемость
MDM2	CDKN2A	<0,001	-2,138	Мут. Искл.

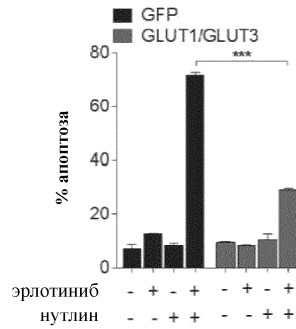
Показаны только важные взаимодействия  
Фиг. 24В



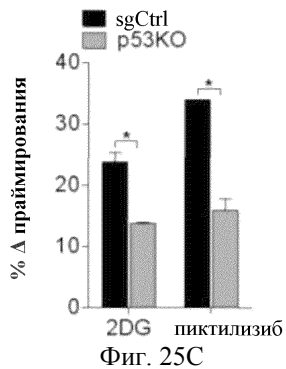
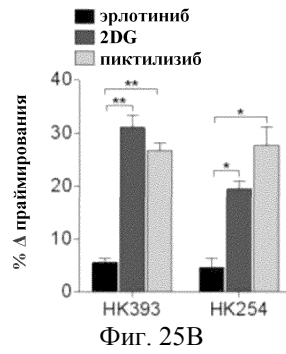
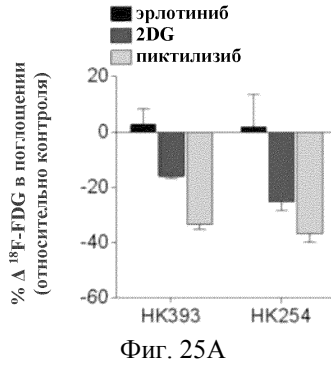
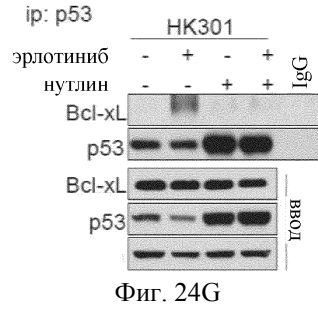
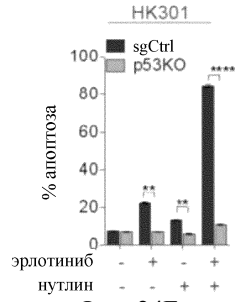
Фиг. 24С



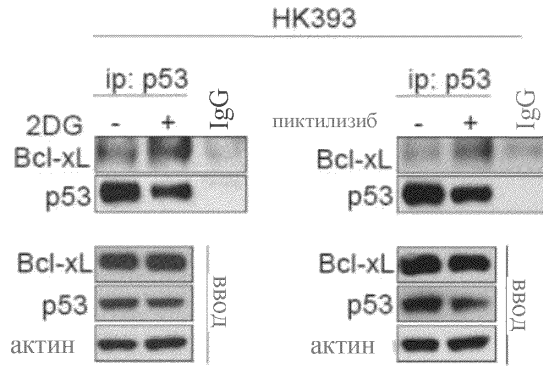
Фиг. 24D



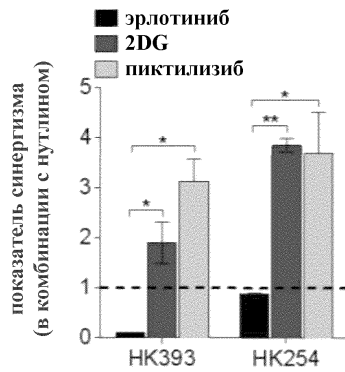
Фиг. 24Е



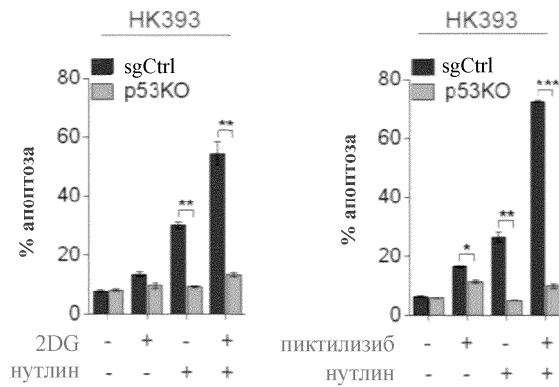




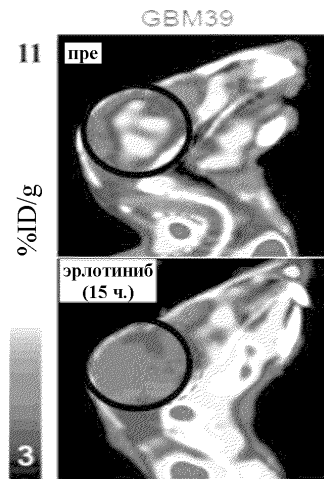
Фиг. 25D



Фиг. 25E



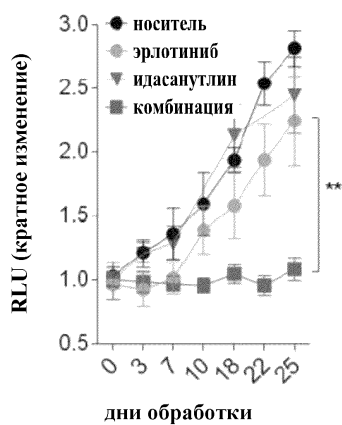
Фиг. 25F



Фиг. 26А

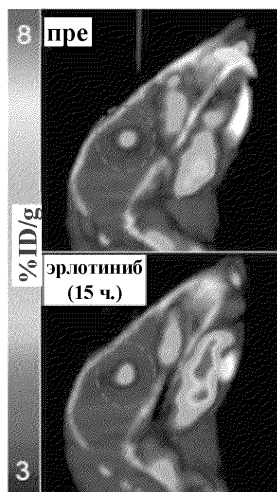
044668

GBM39



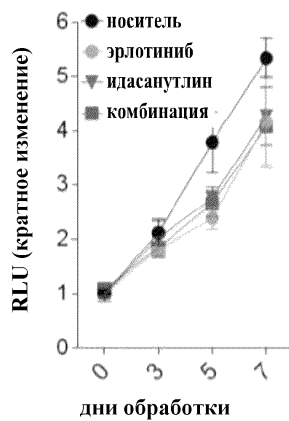
дни обработки  
Фиг. 26В

НК393

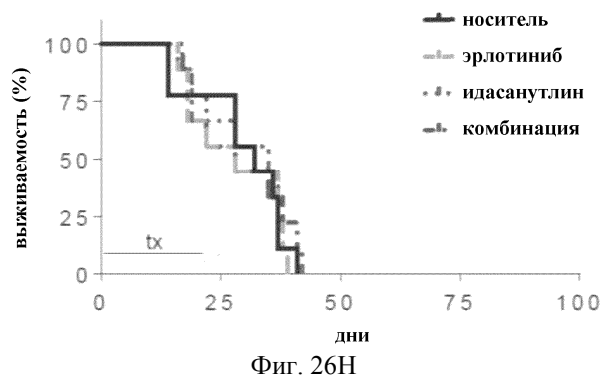
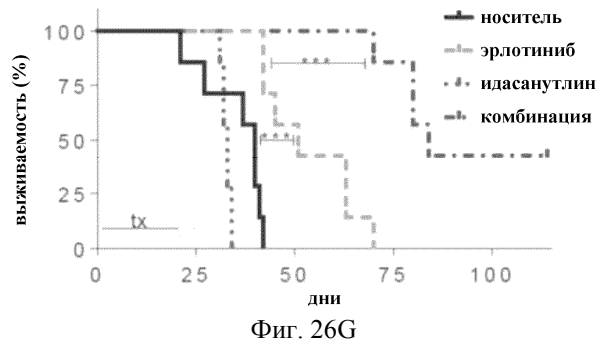
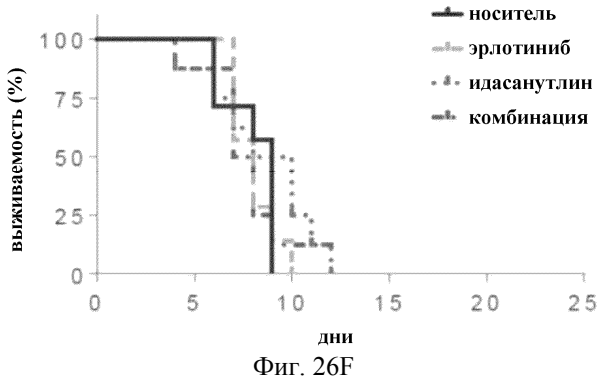
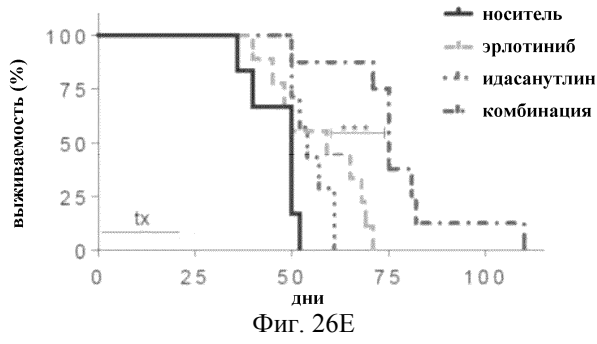


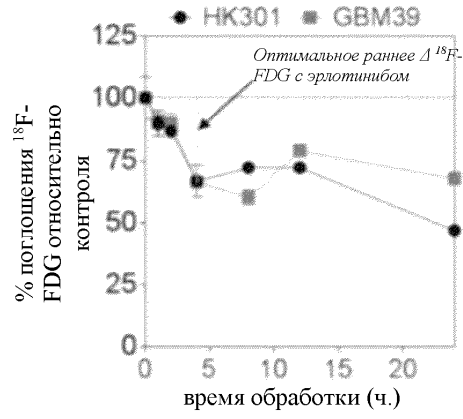
Фиг. 26С

НК393

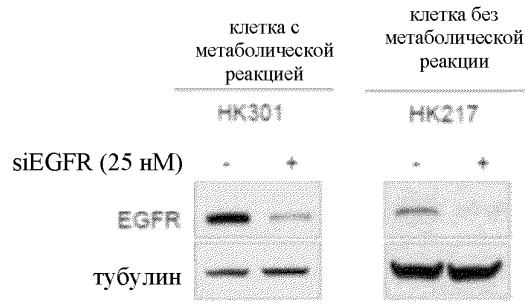


дни обработки  
Фиг. 26D

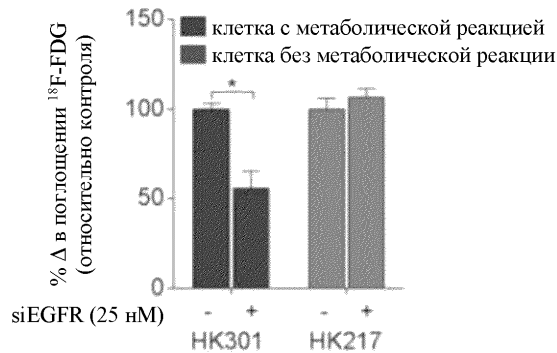




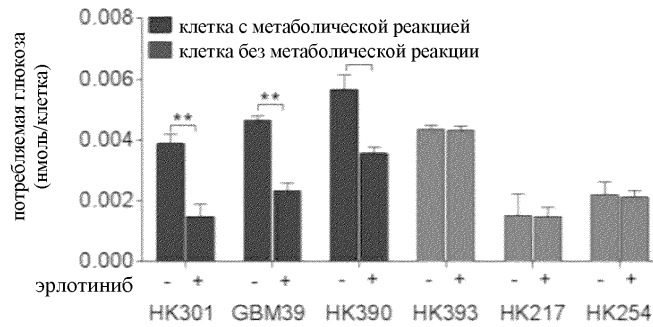
Фиг. 27А



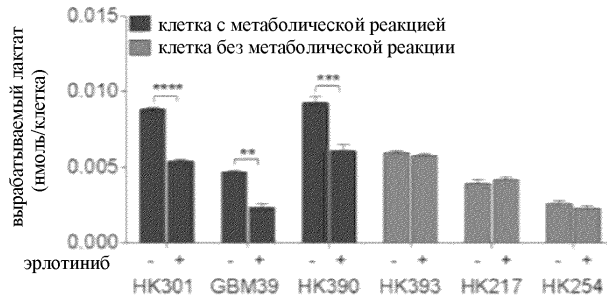
Фиг. 27В



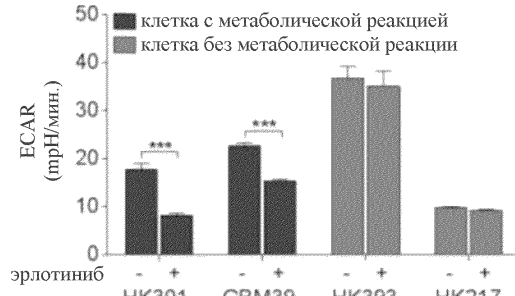
Фиг. 27С



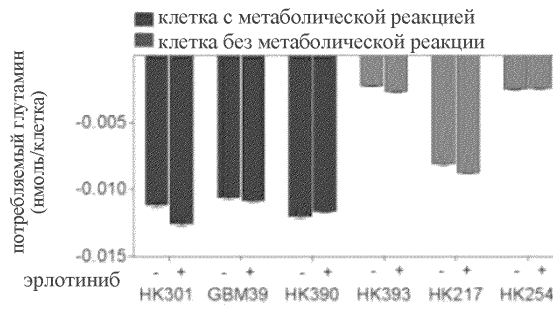
Фиг. 27D



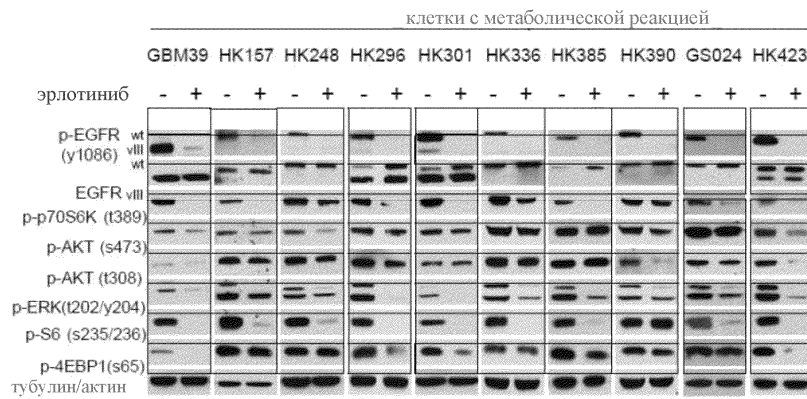
Фиг. 27E



Фиг. 27F

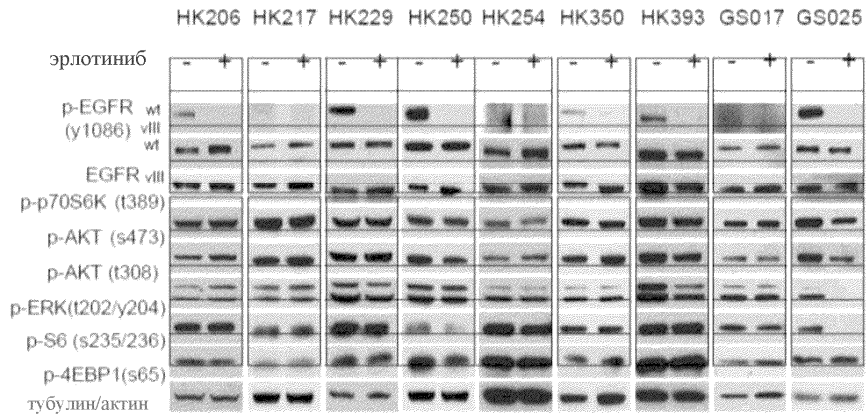


Фиг. 27G

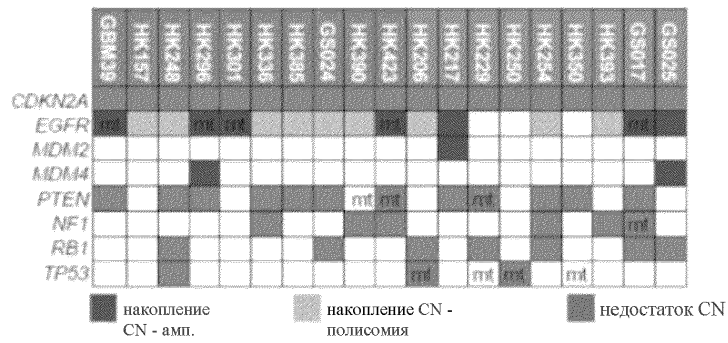


Фиг. 28A

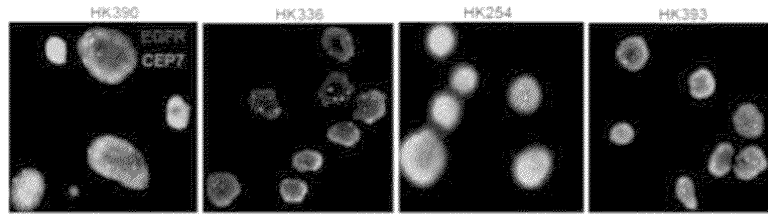
клетки без метаболической реакции



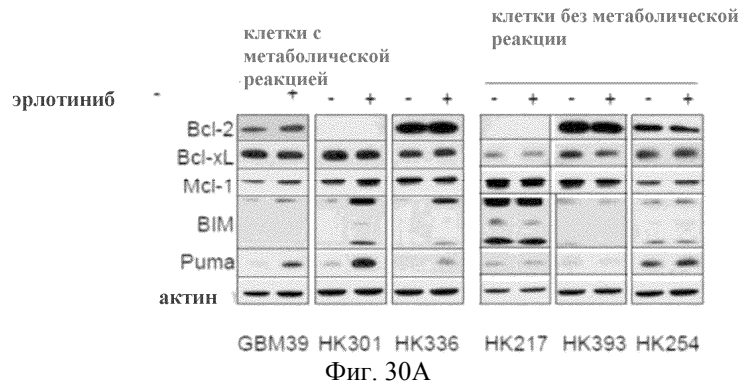
Фиг. 28В



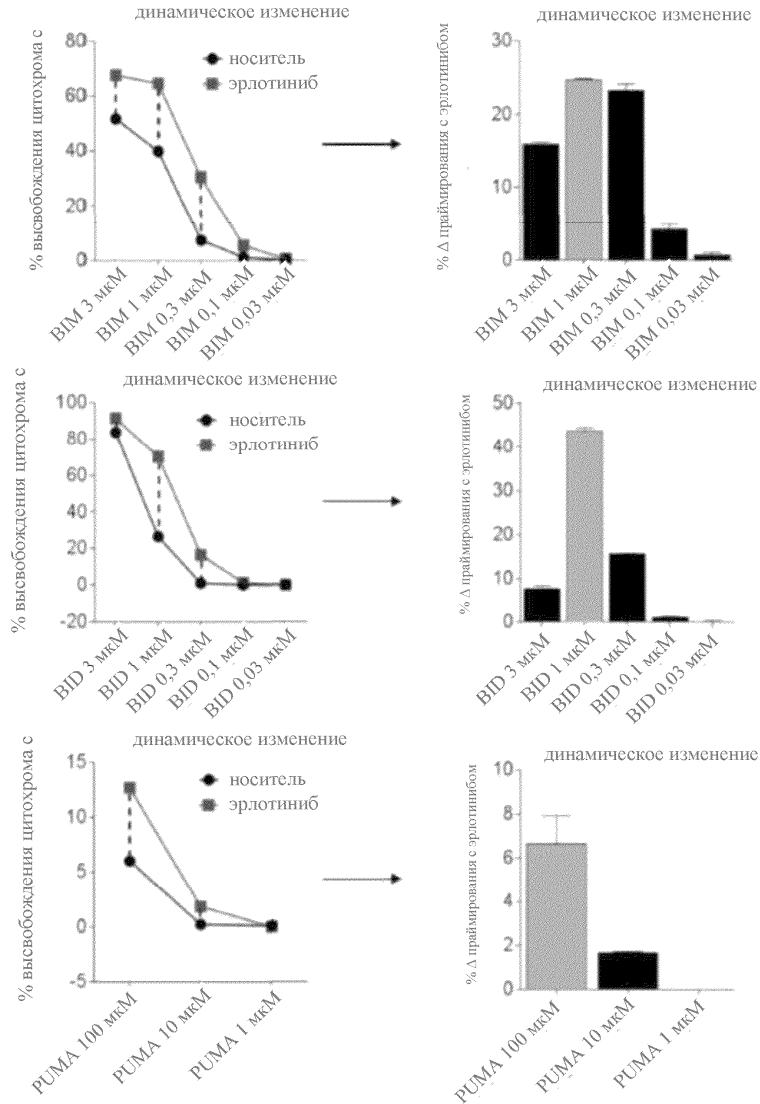
Фиг. 29А



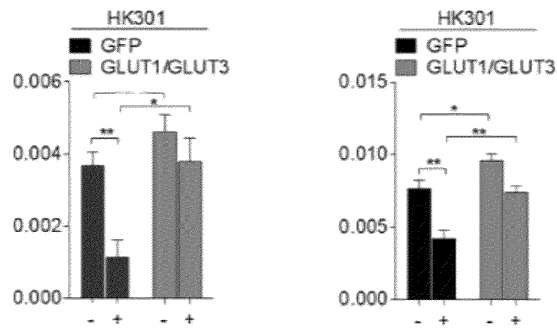
Фиг. 29В



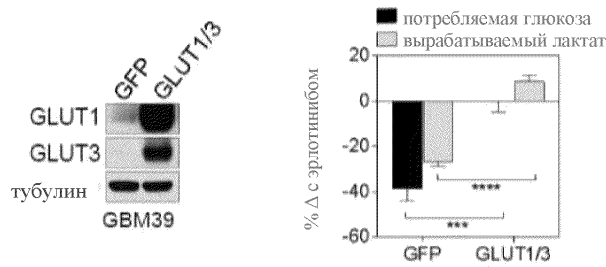
Фиг. 30А



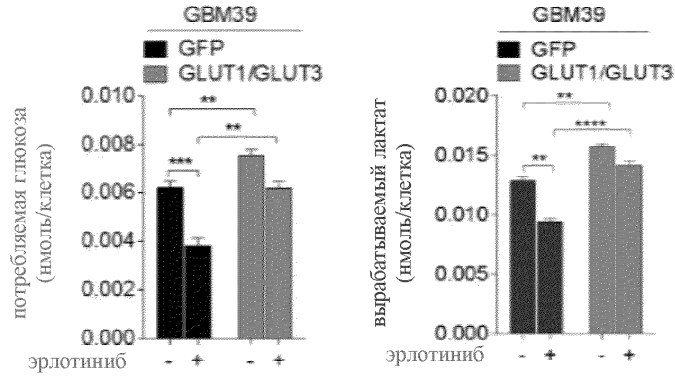
Фиг. 30B



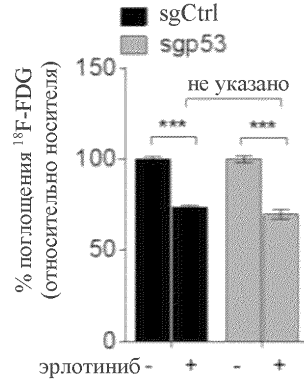
Фиг. 31A



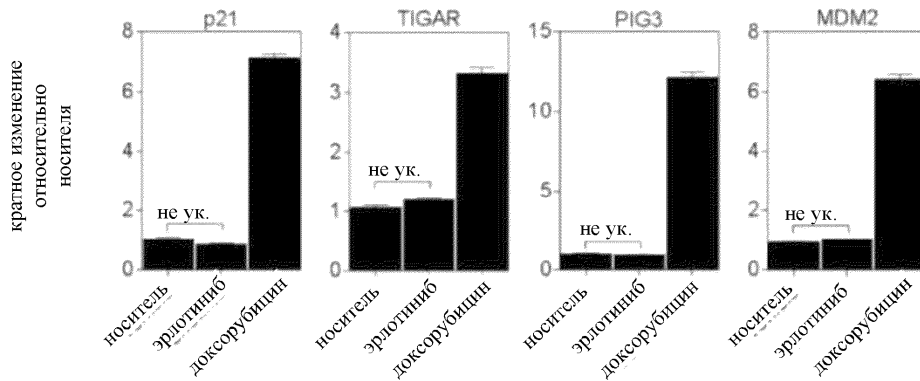
Фиг. 31B



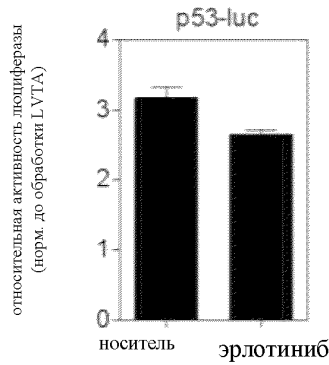
Фиг. 31С



Фиг. 32А



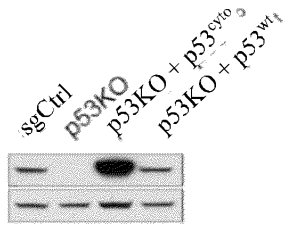
Фиг. 32В



Фиг. 32С

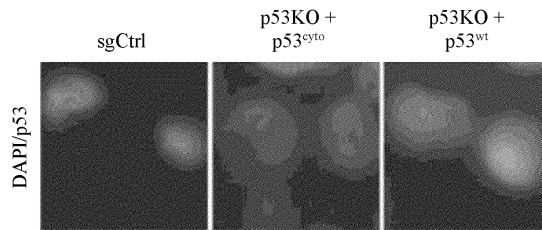


044668

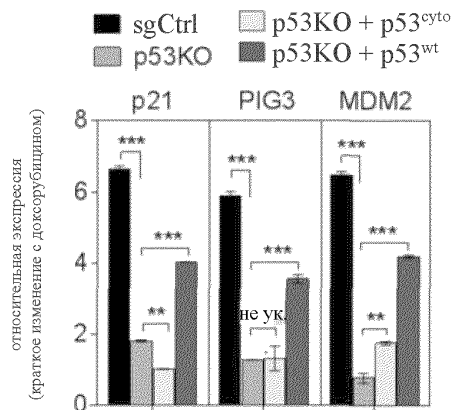


НК336

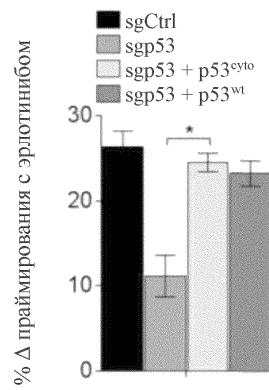
Фиг. 32D



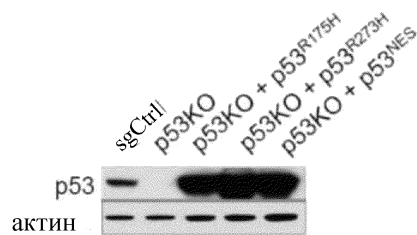
Фиг. 32E



Фиг. 32F

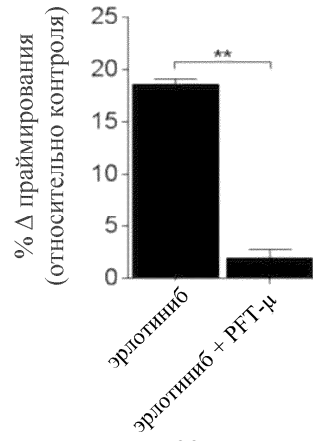


Фиг. 32G

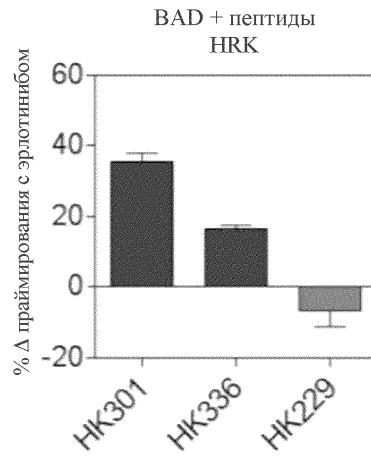


НК301

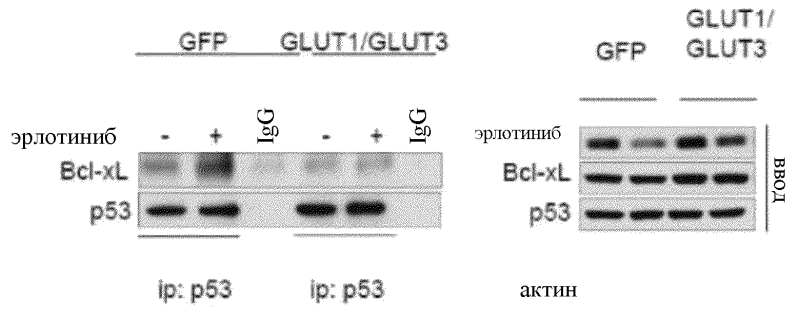
Фиг. 32H



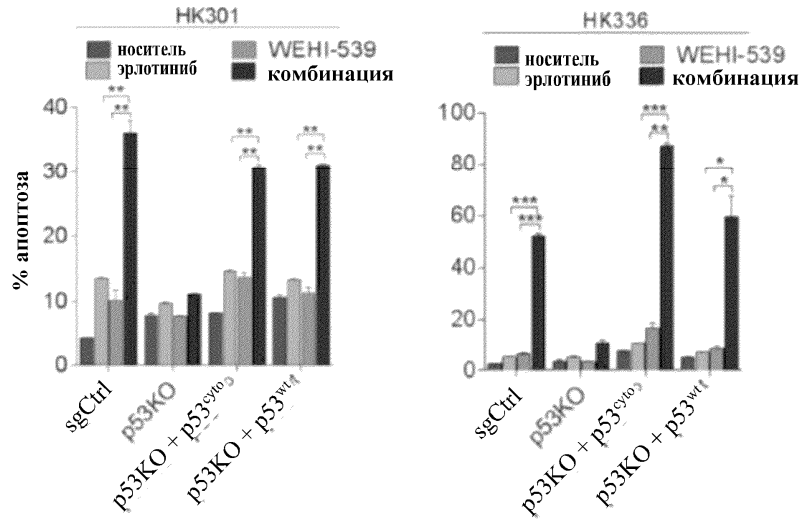
Фиг. 32I



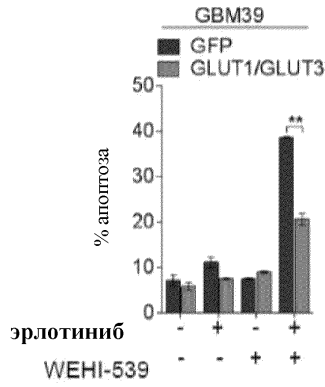
Фиг. 33A



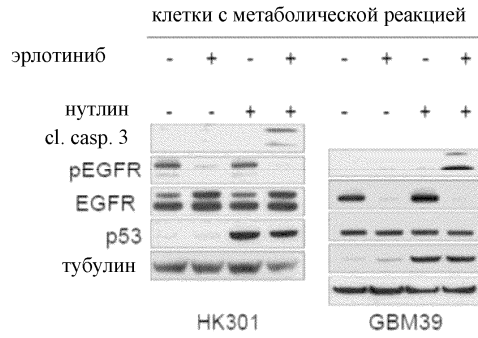
Фиг. 33B



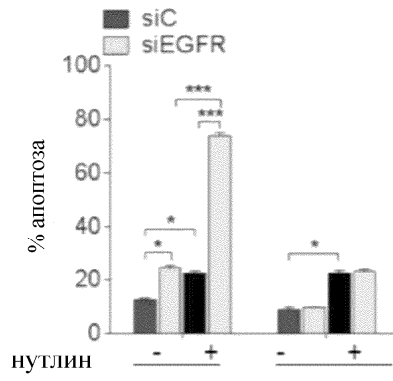
Фиг. 33С



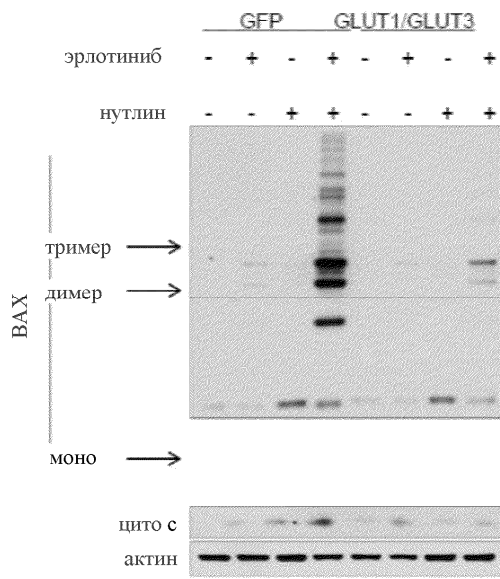
Фиг. 33D



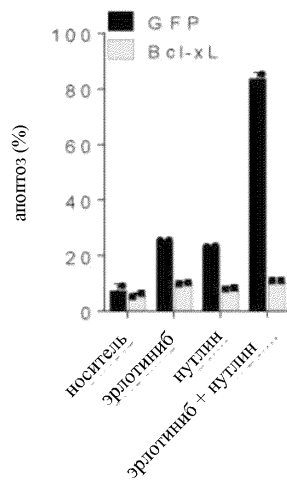
Фиг. 34А



НК301 НК217  
Фиг. 34В

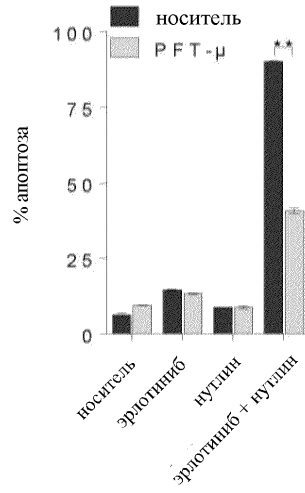


Фиг. 34С

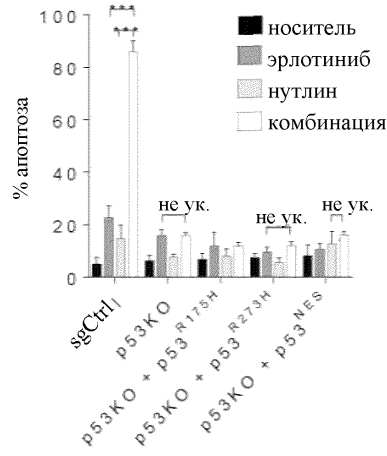


Фиг. 34D

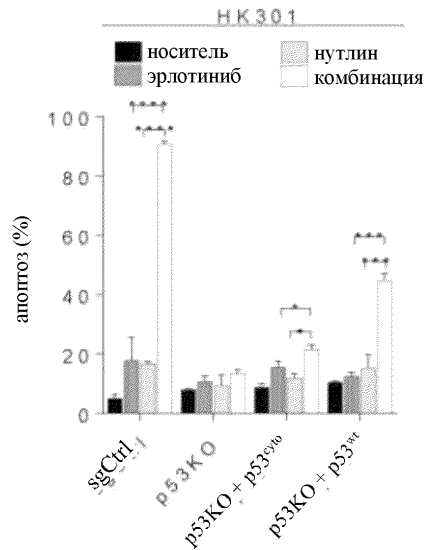
044668



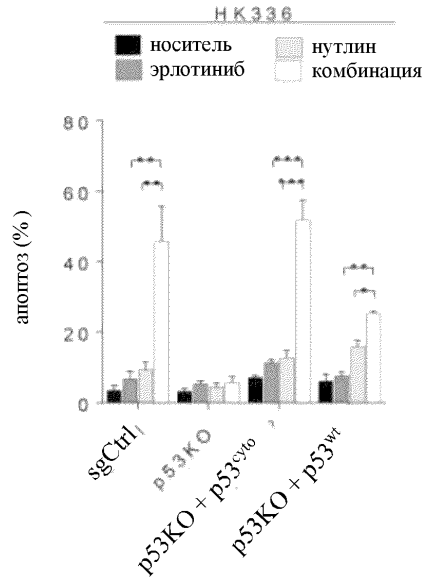
Фиг. 34Е



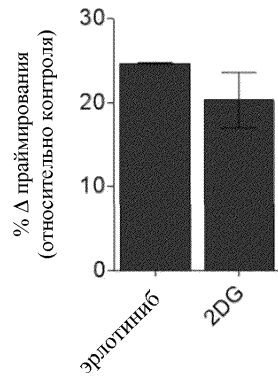
Фиг. 34F



Фиг. 34G

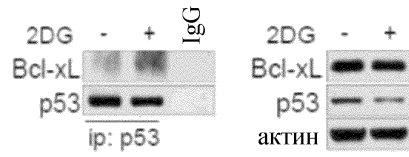


Фиг. 34H



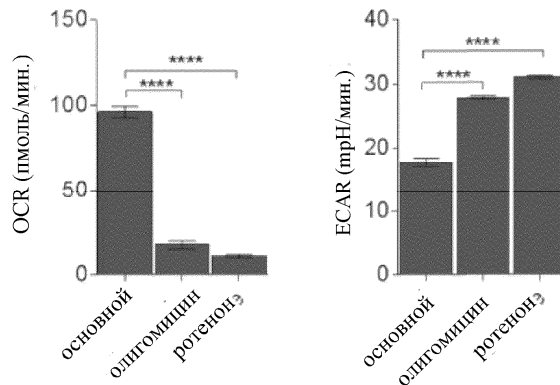
Фиг. 35A

НК301  
(EGFRi клетка с метаболической реакцией)



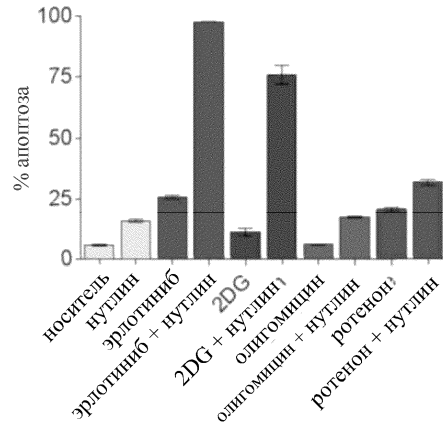
ВВВД

Фиг. 35B

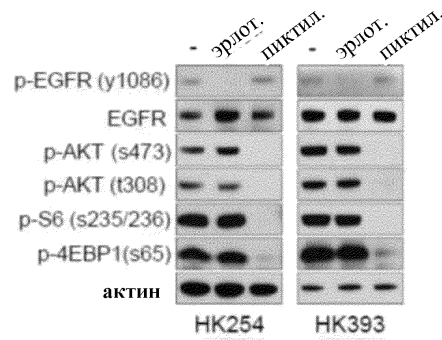


Фиг. 35C

044668

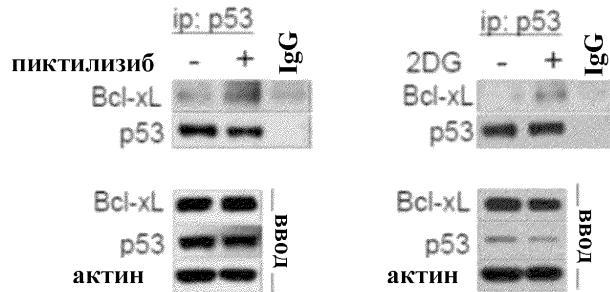


Фиг. 35D

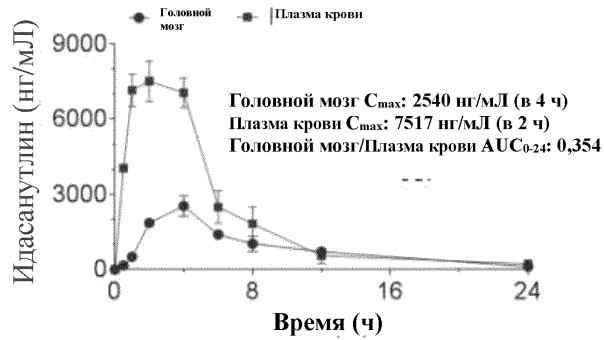


Фиг. 35E

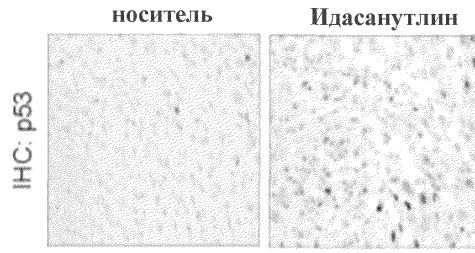
HK254  
(EGFRi клетка без метаболической реакции)



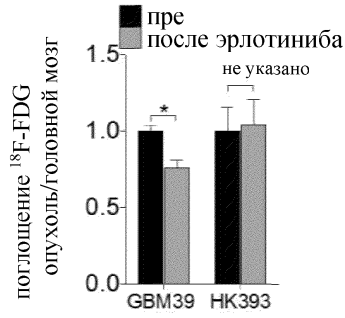
Фиг. 35F



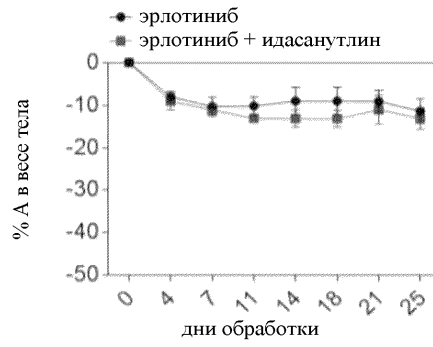
Фиг. 36A



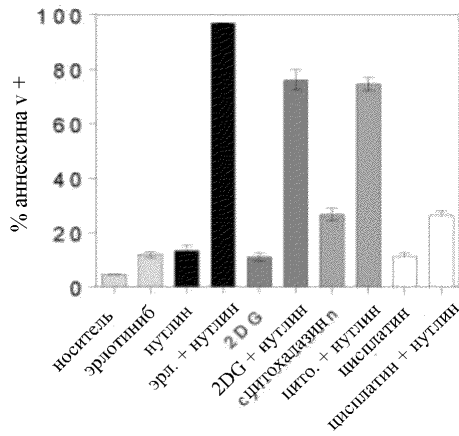
Фиг. 36В



Фиг. 36С

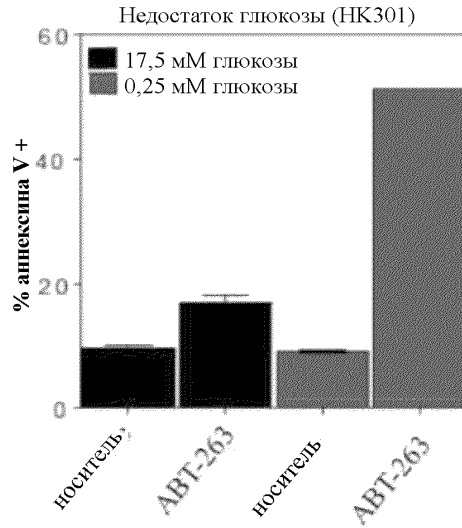


Фиг. 36D

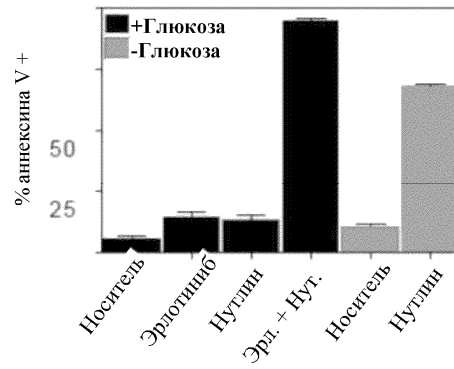


Фиг. 37А



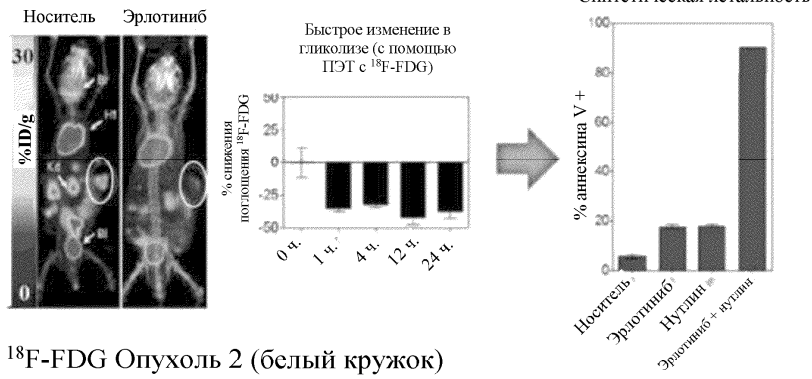


Фиг. 37В

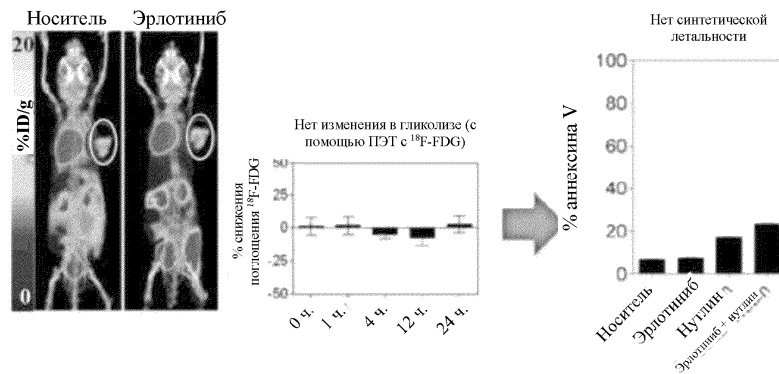


Фиг. 37С

ПЭТ с <sup>18</sup>F-FDG Опухоль 1 (белый кружок)

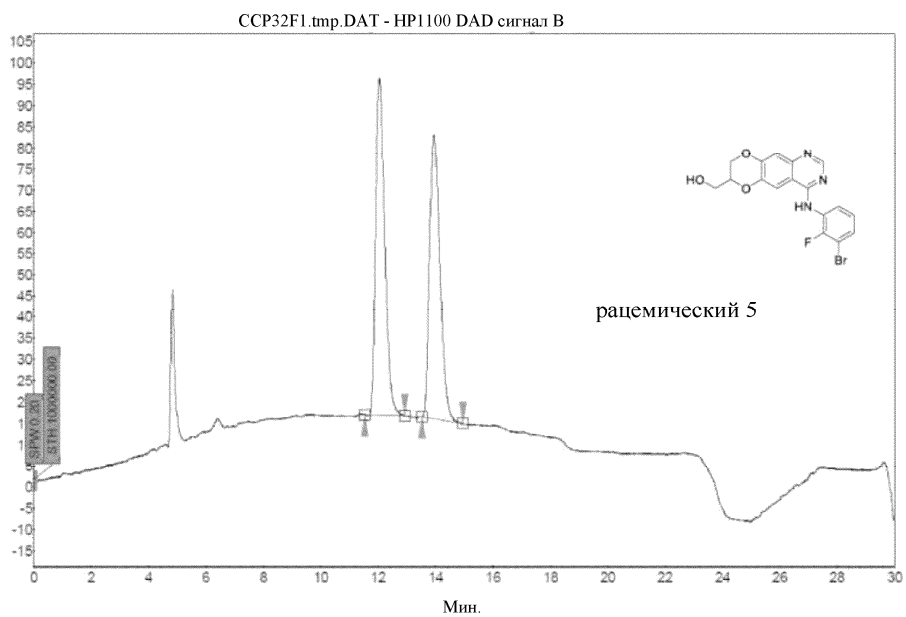


ПЭТ с <sup>18</sup>F-FDG Опухоль 2 (белый кружок)

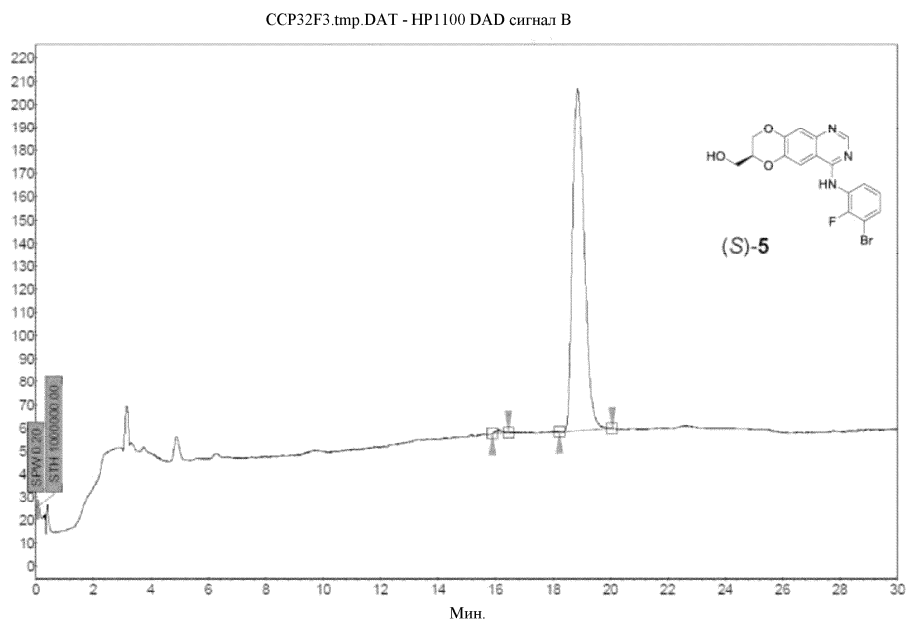


Фиг. 38

044668



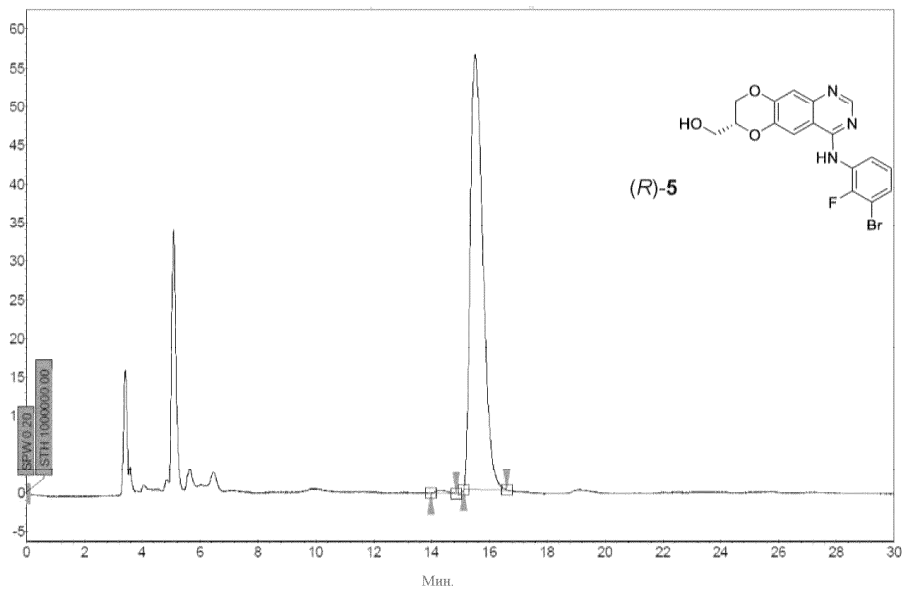
Фиг. 39А



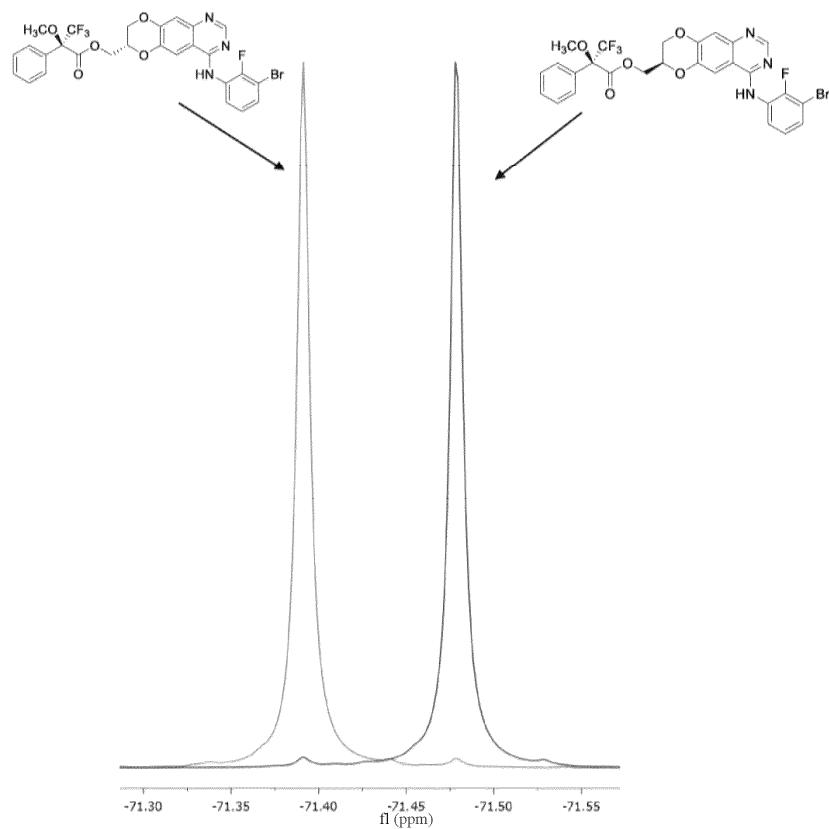
Фиг. 39В

044668

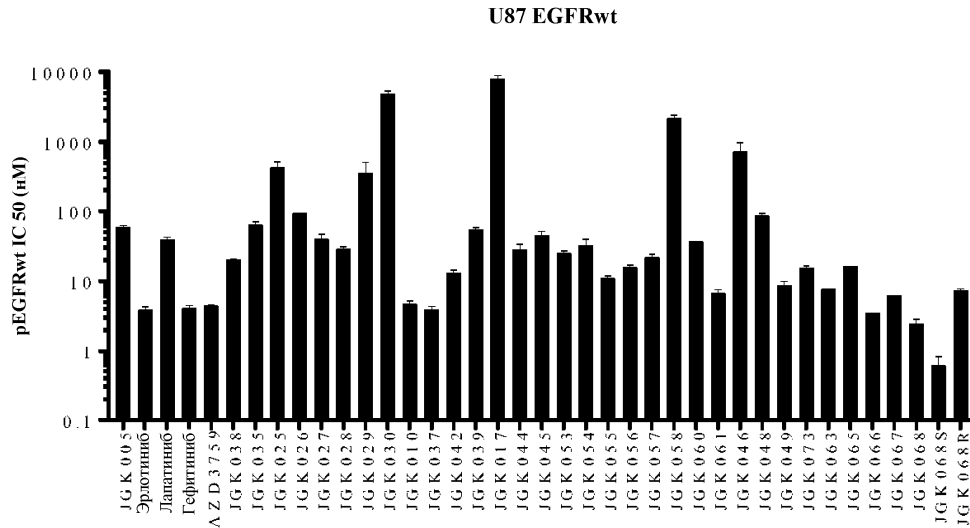
ССР32F2.imp.DAT - HP1100 DAD сигнал B



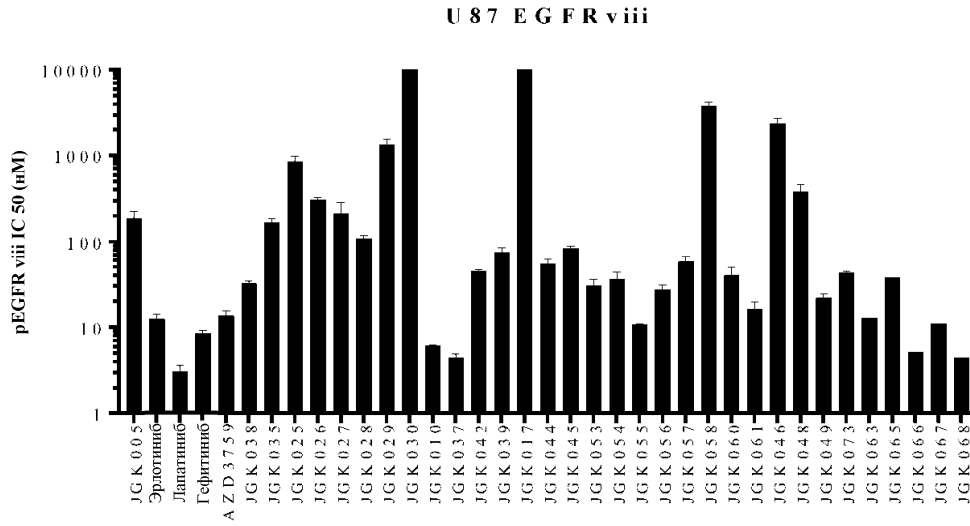
Фиг. 39С



Фиг. 39D

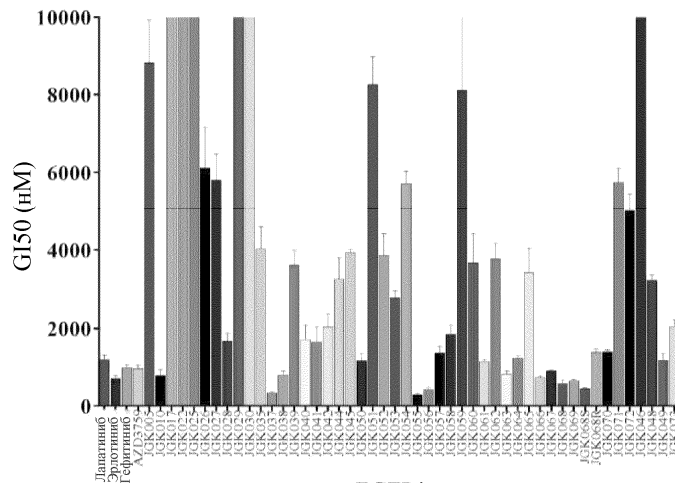


Фиг. 40

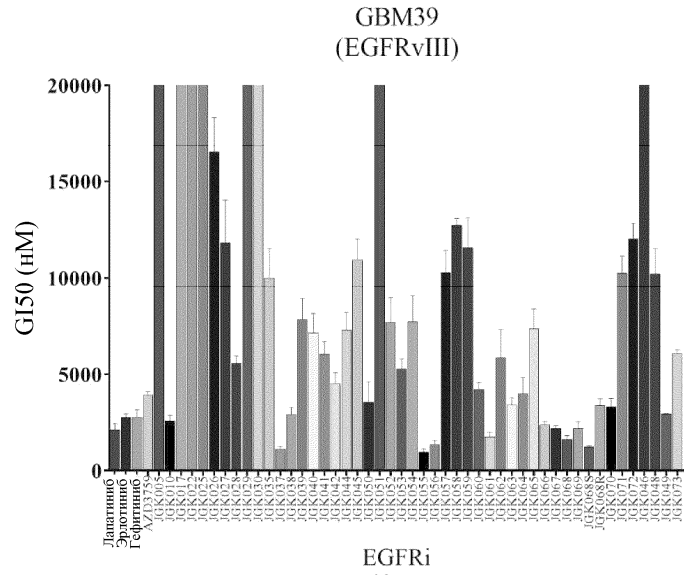


Фиг. 41

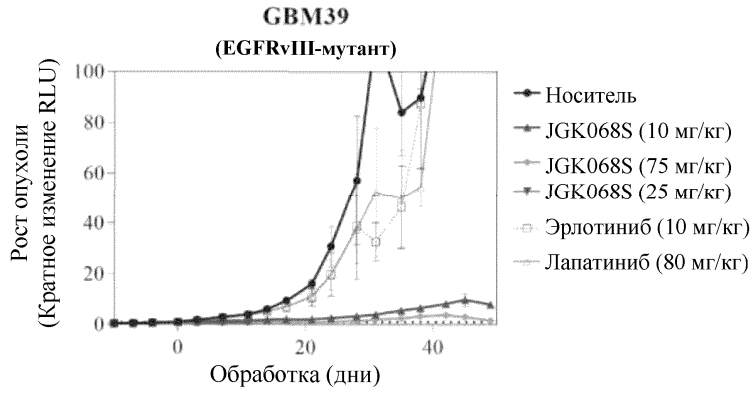
**HK301  
(EGFRvIII)**



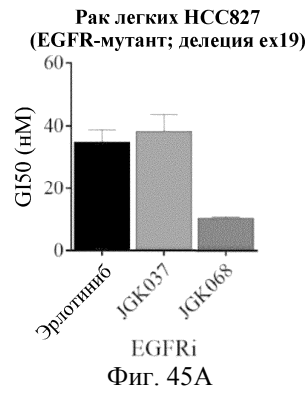
Фиг. 42



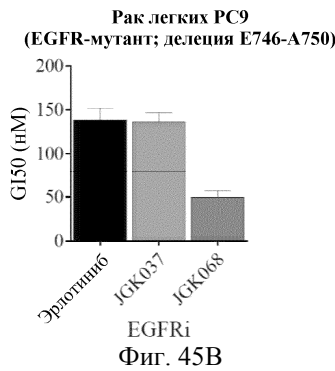
Фиг. 43



Фиг. 44

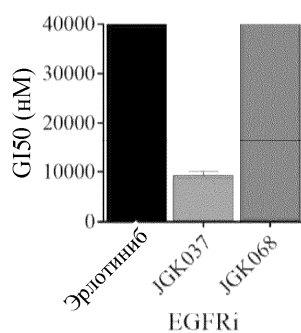


Фиг. 45А



Фиг. 45В

**Рак легких H838  
(Нормальный EGFR)**

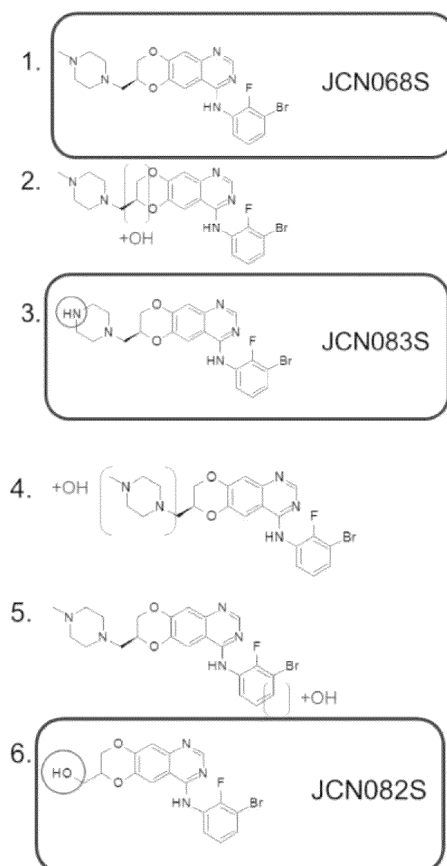


Фиг. 45С

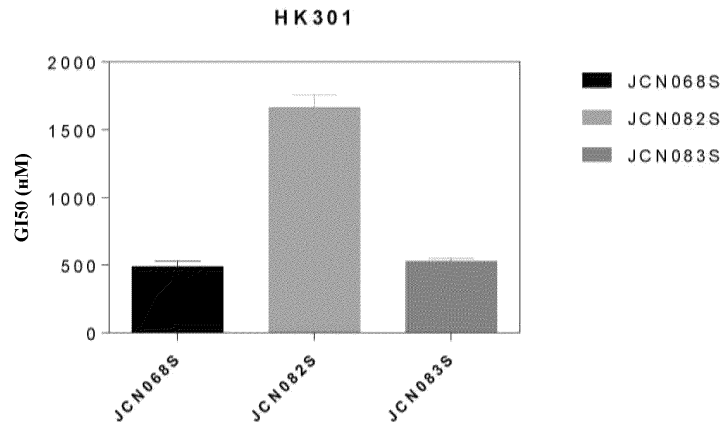
**Рак легких PC9  
(EGFR-мутант; делеция E746-A750)**



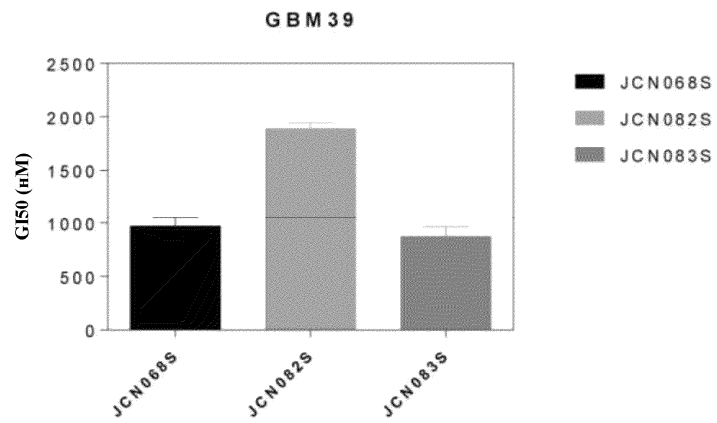
Фиг. 46



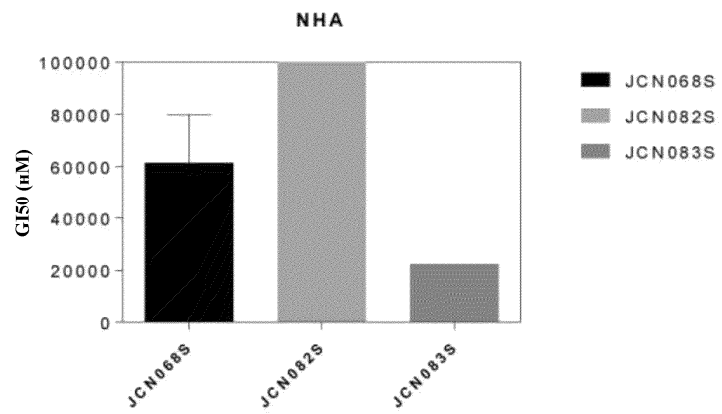
Фиг. 47



Фиг. 48А

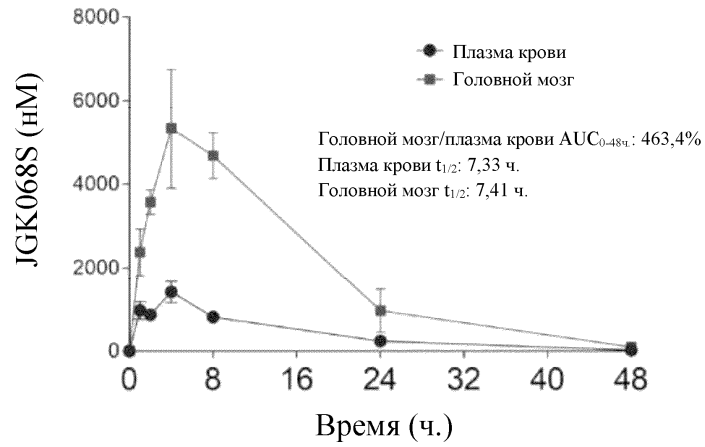


Фиг. 48В



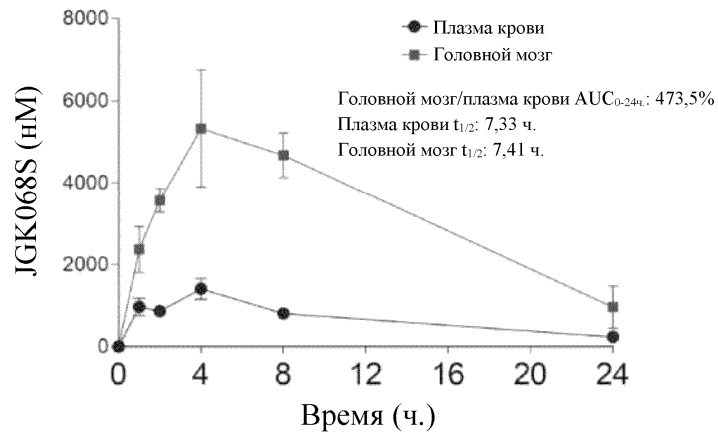
Фиг. 48С

**PK крысы JGK068S (5 мг/кг п/о)**



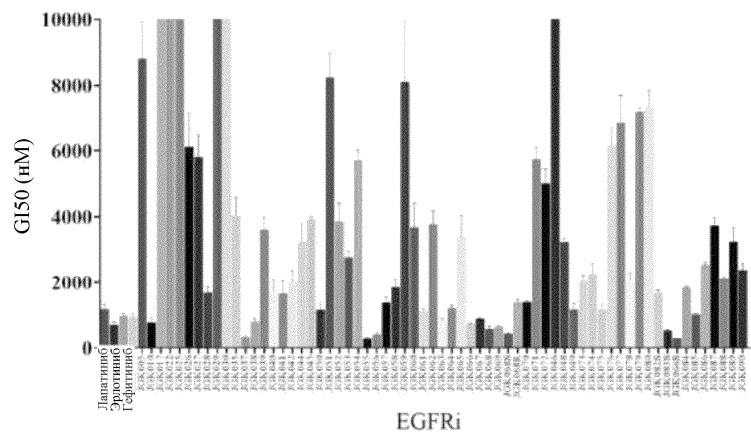
Фиг. 49А

**PK крысы JGK068S (5 мг/кг п/о)**



Фиг. 49В

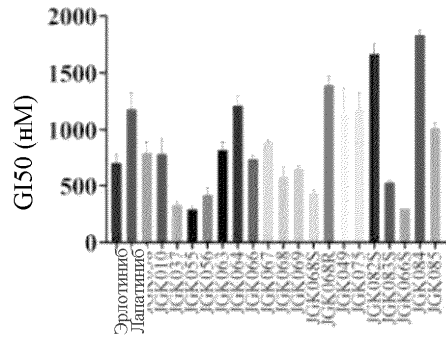
**НК301 GI50**



Фиг. 50А

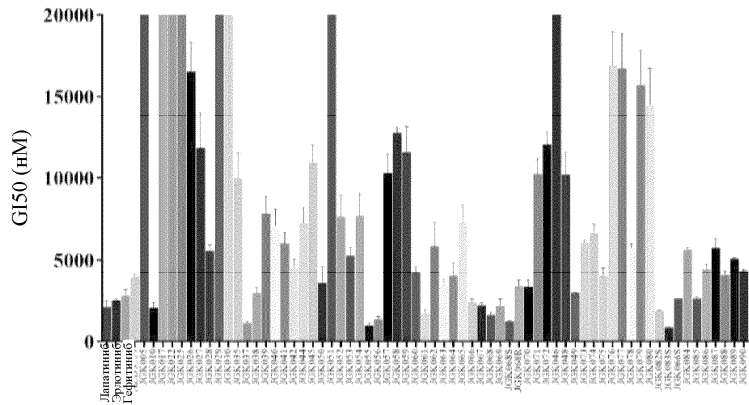


НК301 G150  
(Наиболее эффективный)



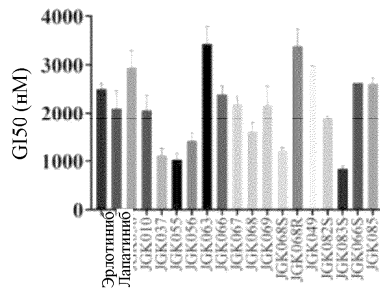
EGFRi  
Фиг. 50B

GBM39 G150

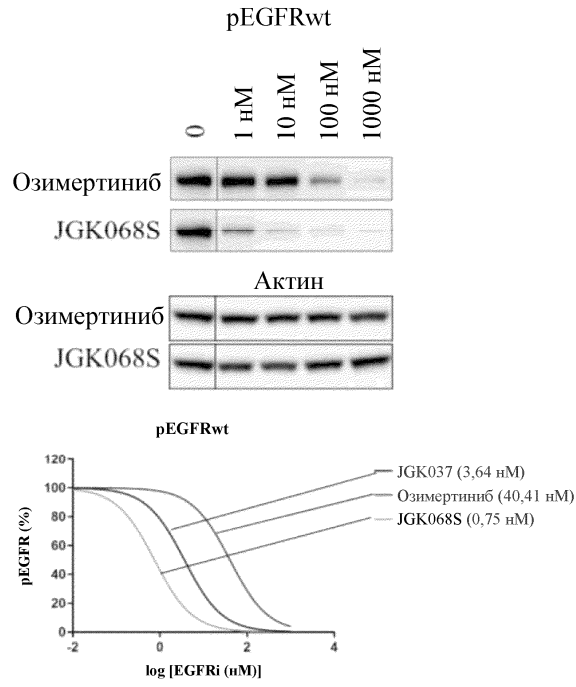


EGFRi  
Фиг. 51A

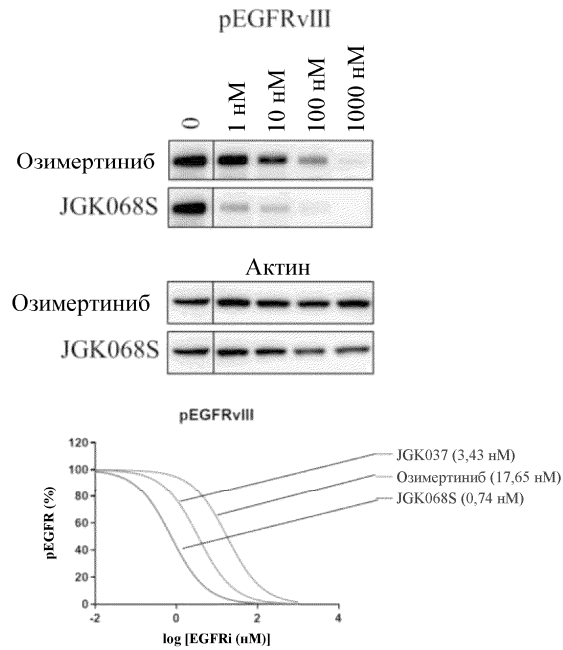
GBM39 G150  
(Наиболее эффективный)



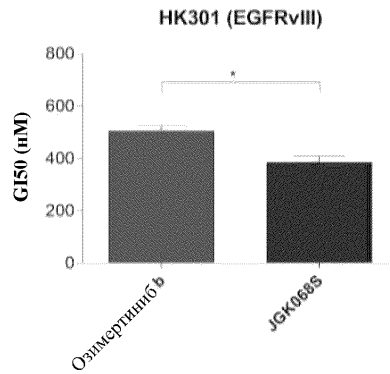
EGFRi  
Фиг. 51B



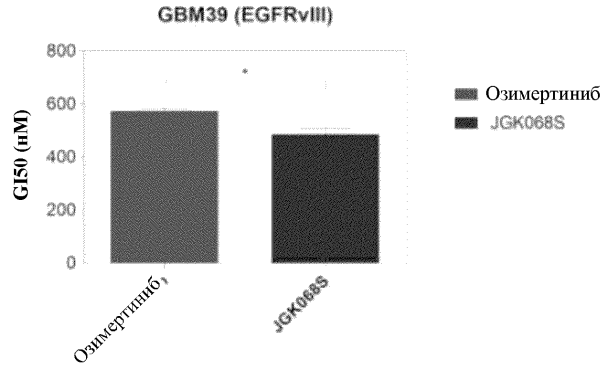
Фиг. 52А



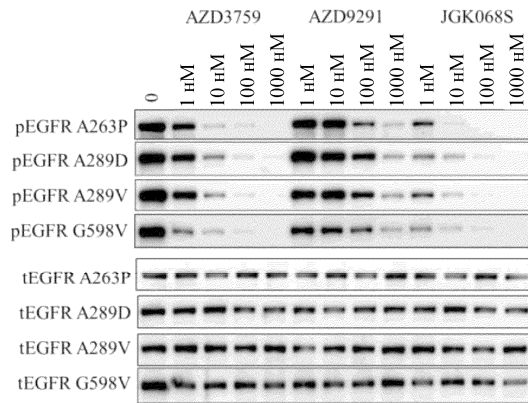
Фиг. 52В



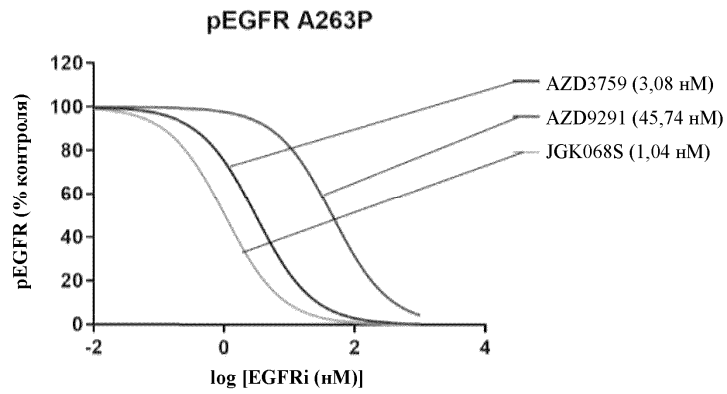
Фиг. 53А



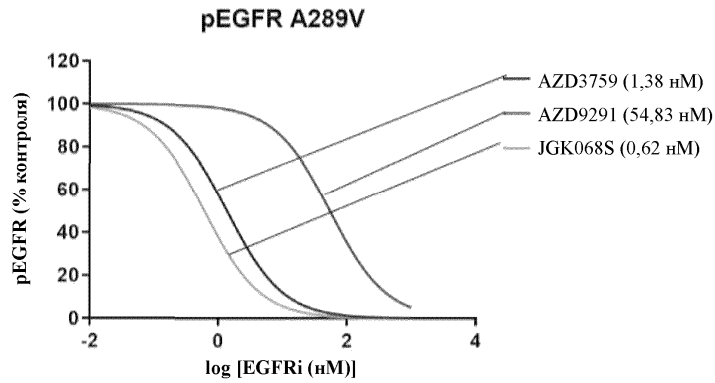
Фиг. 53В



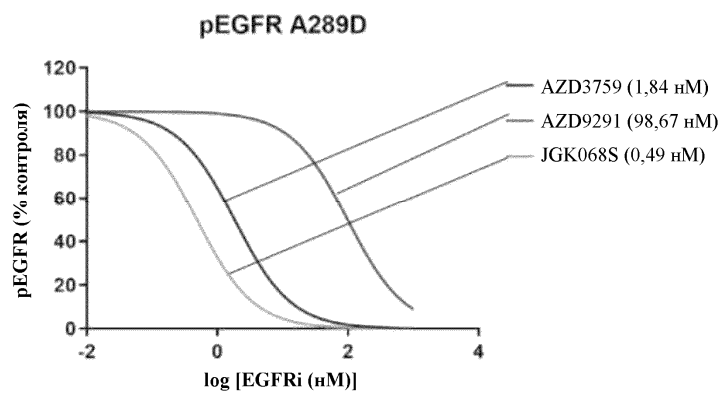
Фиг. 54А



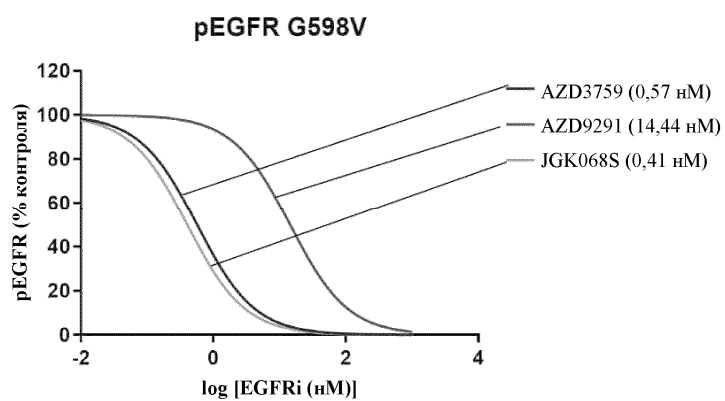
Фиг. 54В



Фиг. 54С



Фиг. 54D



Фиг. 54E

