

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046338

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.01

(21) Номер заявки
202390607

(22) Дата подачи заявки
2021.09.24

(51) Int. Cl. C07D 401/04 (2006.01)
C07D 401/00 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ 1Н-ПИРРОЛО[2,3-с]ПИРИДИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011023186.4; 202011253763.9

(32) 2020.09.25; 2020.11.11

(33) CN

(43) 2023.07.11

(86) PCT/CN2021/120385

(87) WO 2022/063241 2022.03.31

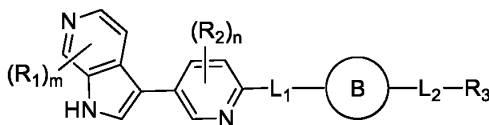
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖАМБО ДРАГ БАНК КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Цянь Вэньюань, Вэй Сявэй, Ян
Чуньдао, Сюй Гуанхай, Цзян Нин,
Чэнь Шухуэй (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2018233526
WO-A1-2018233527
WO-A1-2016179415
WO-A1-2019214681

(57) Предложен ряд соединений 1Н-пирроло[2,3-с]пиридина и их применение, в частности соединения, представленные формулой (P), и их фармацевтически приемлемые соли.



(P)

B1

046338

046338

B1

Изобретение испрашивает приоритет на основании CN202011023186.4, дата подачи 25 сентября 2020 года; а также CN202011253763.9, дата подачи 11 ноября 2020 года.

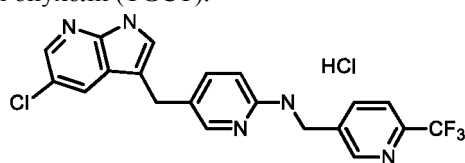
Область техники

Настоящее изобретение относится к ряду соединений 1Н-пирроло[2,3-с]пиридина и их применению, в частности, к соединению формулы (P) и его фармацевтически приемлемой соли.

Уровень техники

Колонiestимулирующий фактор 1 (CSF-1), также известный как макрофагальный колонiestимулирующий фактор (M-CSF), является важным фактором роста, который контролирует рост клеток-предшественников костного мозга, моноцитов, макрофагов, остеокластов, образованных в результате дифференцировки из макрофагов, дендритных клеток и т.д. Чтобы оказывать свои биологические эффекты, он должен связываться с относящимся только к нему рецептором клеточной поверхности CSF-1R. CSF-1R кодируется протоонкогеном c-FMS, поэтому его также называют c-FMS, и он представляет собой рецепторную тирозинкиназу. Связывание CSF-1 с CSF-1R во внеклеточном домене индуцирует димеризацию CSF-1R, что далее приводит к аутофосфорилированию области киназы CSF-1R в клетке. Как только происходит фосфорилирование, CSF-1R действует как стыковочный сайт для нескольких цитоплазматических сигнальных молекул, в конечном итоге вызывая серию сигнальных каскадных реакций. Например, фосфорилирование остатка тирозина в положении 697 CSF-1R может активировать сигнальный путь MAPK, в то время как фосфорилирование его остатка тирозина в положении 721 может инициировать сигнальные пути PI3K и PLCγ. Рецептор колонiestимулирующего фактора-1 (CSF-1R) является ключевой мишенью для регуляции опухолеассоциированных макрофагов в микроокружении опухоли. Многие опухолевые клетки могут секретировать факторы роста, такие как CSF-1, во время процесса роста, а факторы роста могут привлекать макрофаги (опухолеассоциированные макрофаги, TAM) для проникновения в опухолевые области. Макрофаги могут секретировать CSF-1 так же, как и опухолевые клетки, и их проникновение способствует образованию сложного микроокружения опухоли, что может помочь опухолевым клеткам вызывать иммунную толерантность к аутоиммунной функции, тем самым способствуя пролиферации, инвазии и метастазированию опухолевых клеток *in vivo*. Было показано, что блокирование пути CSF-1/CSF1R может значительно уменьшить инфильтрацию макрофагов в месте опухоли, замедлить рост первичной опухоли и уменьшить метастазы опухоли. Таким образом, для иммунотерапии рака стало важной стратегией ингибирование выживаемости/активации макрофагов путем ингибирования передачи сигналов CSF-1/CSF1R.

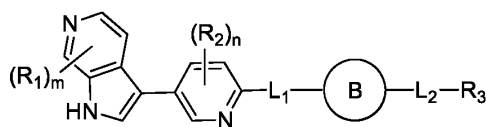
Недавние исследования показали, что ингибиторы CSF-1R можно применять в области лечения заболеваний различными путями. Возможно применение отдельно или также в комбинации с различными противораковыми терапиями, такими как антиангиогенез, адаптивный перенос Т-клеток, лучевая терапия, химиотерапия, терапия иммунных контрольных точек и т.п. Многие лекарственные средства, зарегистрированные для продажи, обладают ингибирующей активностью в отношении CSF-1R, такие как иматиниб, дазатиниб, сунитиниб и тому подобное, но на рынке нет селективного ингибитора CSF-1R. Пексидартиниб (PLX-3397), разработанный Plexxikon и приобретенный Daiichi Sankyo, является двойным ингибитором CSF-1R и c-Kit и в августе 2019 года был одобрен FDA для продажи для лечения теносиновиальной гигантоклеточной опухоли (TGCT).



PLX-3397

Краткое описание

В настоящем описании предложено соединение формулы (P) или его фармацевтически приемлемая соль,



(P)

где R₁ выбран из F, Cl, Br, I, C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, -C(=O)-C₁₋₃ алкила и -C(=O)-NH-C₁₋₃ алкила, при этом указанные C₁₋₃ алкил, C₁₋₃ алкокси, -C(=O)-C₁₋₃ алкил и -C(=O)-NH-C₁₋₃ алкил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a;

R₂ выбран из F, O, Br, I и C₁₋₃ алкила, причем указанный C₁₋₃ алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b;

R₃ выбран из H, C₁₋₃ алкила и C₃₋₅ циклоалкила, причем указанные C₁₋₃ алкил и C₃₋₅ циклоалкил

необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c;

кольцо В выбрано из фенила и 6-членного гетероарила;

m и n каждый независимо выбран из 0, 1 и 2;

L₁ выбран из -N(R_d)-;

L₂ выбран из одинарной связи, -O-, -N(R_d)-C(=O)- и -N(R_d)-C(R_e)(R_f)-;

R_a, R_b и R_c каждый независимо выбран из F, Cl, Br, I и CH₃;

R_d, R_e и R_f каждый независимо выбран из H и CH₃.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R₁, описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃, при этом указанные CH₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃ необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R₁, описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, CHF₂, CF₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R₂, описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I и CH₃, причем CH₃ необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R₂, описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, CH₂F, CHF₂ и CF₃; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R₃, описанный выше, выбран из H, CH₃, CH(CH₃)₂ и циклопропила, причем CH₃, OCH₃ и циклопропил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

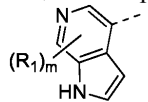
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R₃, описанный выше, выбран из H, CH₃, CF₃, CH(CH₃)₂ и циклопропила; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения L₁, описанный выше, выбран из -NH- и -N(CH₃)-; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

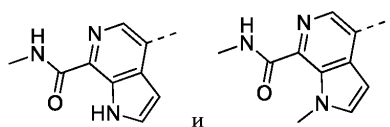
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения L₂, описанный выше, выбран из одинарной связи, -O-, -NH-C(=O)-, -NH-CH₂- и -N(CH₃)-CH₂-; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения кольцо В, описанное выше, выбрано из фенила, пиридинила, пиримидинила, пиазинила и пиридазинила; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения структурная единица

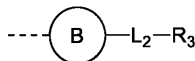


описанная выше, выбрана из

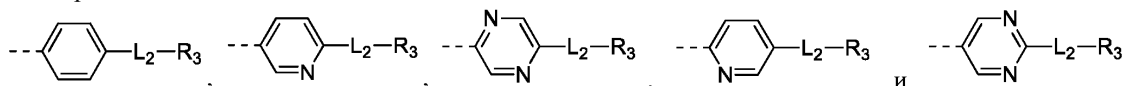


другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения L₂, описанный выше, выбран из структурной единицы

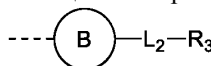


выбранной из

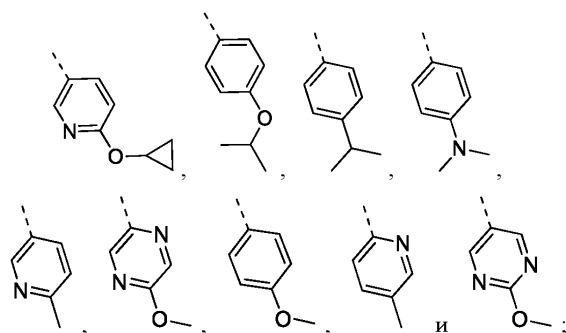


другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения структурная единица

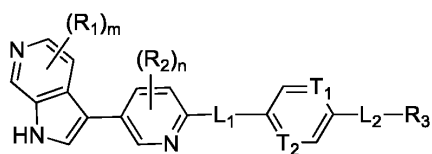


описанная выше, выбрана из



другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В настоящем изобретении предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль,



(I)

где

каждый из T_1 и T_2 независимо выбран из N и CH;

R_1 выбран из F, Cl, Br, I, C_{1-3} алкила, C_{1-3} алкокси, $-C(=O)-C_{1-3}$ алкила и $-C(=O)-NH-C_{1-3}$ алкила, при этом указанные C_{1-3} алкил, C_{1-3} алкокси, $-C(=O)-C_{1-3}$ алкил и $-C(=O)-NH-C_{1-3}$ алкил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a ;

R_2 выбран из F, O, Br, I и C_{1-3} алкила, причем указанный C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b ;

R_3 выбран из C_{1-3} алкила и C_{3-5} циклоалкила, при этом указанные C_{1-3} алкил и C_{3-5} циклоалкил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c ;

m и n каждый независимо выбран из 0, 1 и 2;

L_1 выбран из $-N(R_d)-$;

L_2 выбран из $-O-$, $-N(R_d)-C(=O)-$ и $-N(R_d)-C(R_e)(R_f)-$;

R_a , R_b и R_c каждый независимо выбран из F, Cl, Br, I и CH_3 ;

R_d , R_e и R_f каждый независимо выбран из H и CH_3 .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_1 , описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH_3 , OCH_3 , $-C(=O)-CH_3$ и $-C(=O)-NH-CH_3$, при этом указанные CH_3 , OCH_3 , $-C(=O)-CH_3$ и $-C(=O)-NH-CH_3$ необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a ; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_1 , описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH_3 , CHF_2 , CF_3 , OCH_3 , $-C(=O)-CH_3$ и $-C(=O)-NH-CH_3$; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_2 , описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I и CH_3 , причем CH_3 необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b ; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_2 , описанный выше, выбран из F, Cl, Br, I, CH_3 , CH_2F , CHF_2 и CF_3 ; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

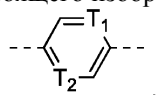
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_3 , описанный выше, выбран из CH_3 и циклопропила, причем CH_3 и циклопропил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c ; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения R_3 , описанный выше, выбран из CH_3 , CF_3 и циклопропила; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

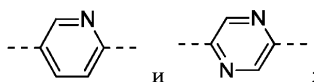
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения L_1 , описанный выше, выбран из $-NH-$ и $-N(CH_3)-$; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения L_2 , описанный выше, выбран из $-O-$, $-NH-C(=O)-$ и $-NH-CH_2-$; другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

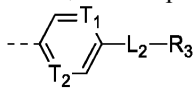
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения структурная единица



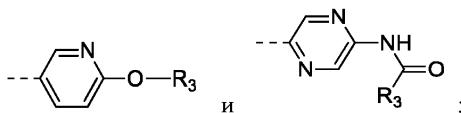
описанная выше, выбрана из



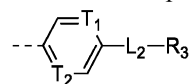
другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения структурная единица



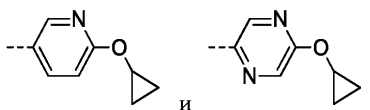
описанная выше, выбрана из



другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения структурная единица



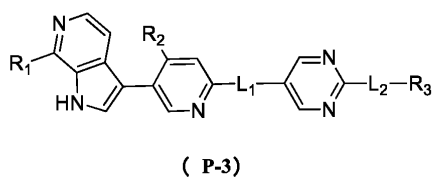
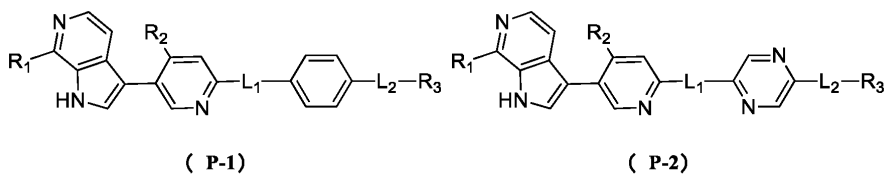
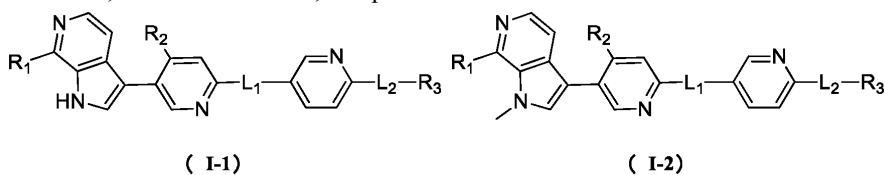
описанная выше, выбрана из



другие переменные являются такими, как определено в настоящем документе.

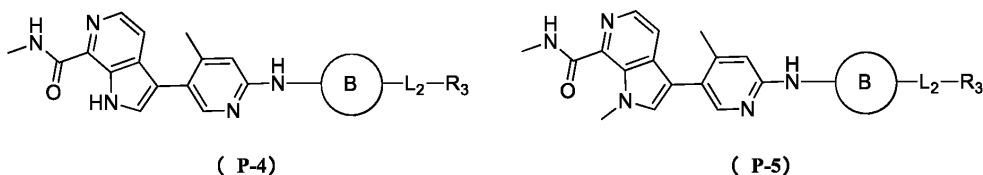
Еще некоторые другие варианты реализации настоящего изобретения получены из любой комбинации переменных, описанных выше.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения соединение или его фармацевтически приемлемая соль, описанные выше, выбраны из:

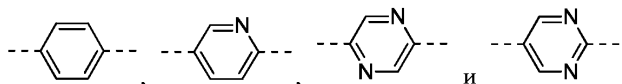


где R_1 , R_2 , R_3 , L_1 и L_2 являются такими, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения соединение или его фармацевтически приемлемая соль, описанные выше, выбраны из:



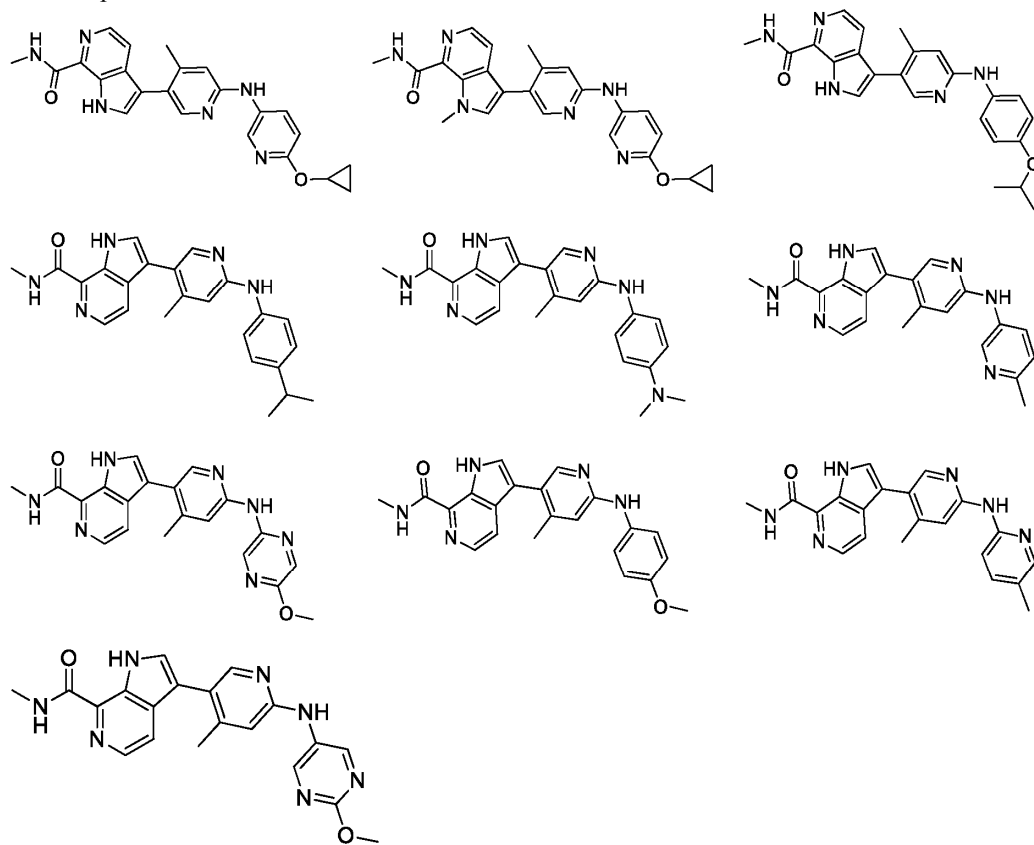
где кольцо B выбрано из



R_3 и L_2 являются такими, как определено в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложены соединения следующих формул или их фар-

мацевтически приемлемые соли



В настоящем документе также предложено применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли, описанных выше, для получения лекарственного средства для лечения теносиновиальной гигантоклеточной опухоли.

Технические результаты

Соединения согласно настоящему изобретению оказывают значительное ингибирующее действие на киназу CSF-1R; соединения согласно настоящему изобретению имеют слабую степень ингибирования в отношении пяти изоферментов CYP и снижают риск, вызванный комбинацией лекарственных средств; соединения согласно настоящему изобретению обладают превосходными фармакокинетическими свойствами и эффективностью *in vivo*.

Определения и описание

Если не указано иное, следующие термины и выражения, используемые в настоящем документе, предназначены для того, чтобы иметь следующие значения. Конкретный термин или выражение, если не указано иное, не следует рассматривать как неопределенные или неясные, а следует толковать в соответствии с их общим значением. Когда речь идет о торговом наименовании, предполагается, что оно относится к соответствующему коммерческому продукту или его активному ингредиенту. Термин "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем документе для тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках здравого медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений и соразмерны с разумным соотношением польза/риск.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли соединения по настоящему изобретению, которую получают из соединения, имеющего конкретные заместители, раскрытые в настоящем документе, и относительно нетоксичной кислоты или основания. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержат относительно кислую функциональную группу, соли присоединения оснований могут быть получены путем приведения в контакт нейтральной формы такого соединения с достаточным количеством основания в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований включают соли натрия, калия, кальция, аммония, органического амина или магния или подобные соли. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержат относительно основную функциональную группу, соль присоединения кислоты может быть получена путем приведения нейтральной формы такого соединения в контакт с достаточным количеством кислоты в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, угольная кислота, бикарбонатный ради-

кал, фосфорная кислота, моногидрофосфат, дигидрофосфат, серная кислота, сульфат водорода, иодистоводородная кислота и фосфорная кислота; и соли, полученные из органических кислот, такие как уксусная кислота, пропионовая кислота, изомаляновая кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, бензойная кислота, янтарная кислота, субериновая кислота, фумаровая кислота, молочная кислота, миндальная кислота, фталевая кислота, бензолсульфоновая кислота, р-толуолсульфоновая кислота, лимонная кислота, винная кислота и метансульфоновая кислота. Также включены соли аминокислот (например, аргинин) и соли органических кислот, таких как глюкуроновая кислота. Некоторые конкретные соединения согласно настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, которые позволяют превращать соединения в соли присоединения основания или кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, содержащего кислотную или основную группу, обычными химическими способами. Как правило, такие соли получают с помощью следующего способа: приведение во взаимодействие соединения в форме свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или органическом растворителе или их смеси.

Если не указано иное, термин "изомер" предназначен для включения геометрических изомеров, цис-транс-изомеров, стереоизомеров, энантиомеров, оптических изомеров, диастереоизомеров и таутомеров.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть представлены в форме конкретного геометрического изомера или стереоизомера. Все такие соединения предусмотрены в настоящем документе, включая их цис- и транс-изомеры, (-) и (+) энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереоизомеры, (D)-изомеры, (L)-изомеры и рацемические смеси и другие смеси, такие как смеси, обогащенные энантиомером или диастереомером, и они все включены в объем настоящего изобретения. Заместители, такие как алкил, могут иметь дополнительный асимметрический атом углерода. Все указанные изомеры и их смеси включены в объем настоящего описания.

Если не указано иное, термин "энантиомер" или "оптический изомер" относится к стереоизомерам, которые являются зеркальными отражениями друг друга.

Если не указано иное, термин "цис-транс-изомер" или "геометрический изомер" является результатом неспособности одинарной связи кольцевого атома углерода или двойной связи свободно вращаться.

Если не указано иное, термин "диастереоизомер" относится к стереоизомерам, в которых молекулы имеют два или более хиральных центра и не являются зеркальными отражениями друг друга.

Если не указано иное, "(D)" или "(+)" означает правовращение, "(L)" или "(-)" означает левовращение, а "(DL)" или "(±)" означает рацемизацию.

Если не указано иное, абсолютная конфигурация стереоцентра представлена клинообразной сплошной связью (▲) и клинообразной пунктирной связью (⋯), а относительная конфигурация стереоцентра представлена прямой сплошной связью (—) и прямой пунктирной связью (⋯). Волнистая линия (~~~~) представляет собой клиновидную сплошную связь (▲) или клиновидную пунктирную связь (⋯), или волнистая линия (~~~~) представляет собой прямую сплошную связь (—) и прямую пунктирную связь (⋯).

Если не указано иное, термин "обогащенный одним изомером", "обогащенный изомером", "обогащенный одним энантиомером" или "обогащенный энантиомером" означает, что содержание одного из изомеров или энантиомеров составляет менее 100% и более или равно 60%, или более или равно 70%, или более или равно 80%, или более или равно 90%, или более или равно 95%, или более или равно 96%, или более или равно 97%, или более или равно 98%, или более или равно 99%, или более или равно 99,5%, или более или равно 99,6%, или более или равно 99,7%, или более или равно 99,7%, или более или равно 99,8%, или более или равно 99,8%, или более или равно 99,9%. Если не указано иное, термин "изомерный избыток" или "энантиомерный избыток" относится к разнице между относительными процентными содержаниями двух изомеров или энантиомеров. Например, если содержание одного из изомеров или энантиомеров составляет 90%, а содержание другого изомера или энантиомера составляет 10%, то изомерный или энантиомерный избыток (значение ее) составляет 80%.

Оптически активные (R)- и (S)-изомеры и D и L изомеры могут быть получены с помощью хирального синтеза или хиральных реагентов или других обычных способов. Если необходимо получить один энантиомер определенного соединения согласно настоящему изобретению, желаемый чистый энантиомер можно получить путем асимметрического синтеза или дериватизации с использованием хирального вспомогательного соединения, при этом полученную диастереомерную смесь отделяют и вспомогательную группу отщепляют. Альтернативно, когда молекула содержит основную функциональную группу (такую как аминогруппа) или кислотную функциональную группу (такую как карбоксил), соединение реагирует с соответствующей оптически активной кислотой или основанием с образованием соли диастереоизомера, которую затем подвергают разрешению диастереоизомеров обычными способами в данной области техники для получения чистого энантиомера. Кроме того, энантиомер и диастереоизомер обычно выделяют с помощью хроматографии с использованием хиральной стационарной фазы, необязательно в

сочетании с химической дериватизацией (например, получением карбамата из аминов).

Соединения согласно настоящему изобретению могут содержать не встречающуюся в естественных условиях долю атомного изотопа в одном или более атомах, составляющих соединение. Например, соединение может быть помечено радиоизотопом, таким как тритий (^3H), йод-125 (^{125}I) или С-14 (^{14}C). В другом примере водород может быть заменен дейтерием с образованием дейтерированного лекарственного средства, и связь, образованная дейтерием и углеродом, является более прочной, чем связь, образованная обычным водородом и углеродом. По сравнению с лекарственным средством, не содержащим дейтерий, дейтерированное лекарственное средство обладает преимуществами, выражающимися в снижении токсического побочного эффекта, повышении стабильности, повышении эффективности, увеличении биологического периода полувыведения и тому подобного. Все изотопные вариации соединения согласно настоящему изобретению, независимо от того, являются ли они радиоактивными или нет, включены в объем настоящего изобретения.

Термин "необязательный" или "необязательно" означает, что впоследствии описанное событие или обстоятельство может произойти, но это не обязательно, и настоящее описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда не происходит.

Термин "замещенный" означает, что один или более атомов водорода при конкретном атоме замещены заместителями, которые могут включать дейтерий и варианты водорода, при условии, что валентность конкретного атома является нормальной, а замещенное соединение является стабильным. Когда заместитель представляет собой кислород (т.е., =O), это означает, что замещены два атома водорода. Замена кислородом не происходит на ароматических группах. Термин "необязательно замещенный" означает, что атом может быть замещен заместителем или нет. Если не указано иное, тип и количество заместителя могут быть произвольными до тех пор, пока это является химически достижимым. Когда любая переменная (например, R) встречается более одного раза в составе или структуре соединения, переменная определяется независимо в каждом случае. Таким образом, например, если группа замещена 0-2 R, группа может быть необязательно замещена до двух R, и определение R в каждом случае является независимым. Кроме того, комбинация заместителя и/или его варианта допустима только в том случае, если комбинация может привести к образованию стабильного соединения.

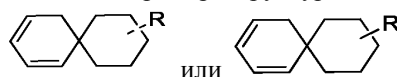
Когда число связывающей группы равно 0, например, $-(\text{CRR})_0-$, это означает, что связывающая группа представляет собой одинарную связь.

Когда число заместителя равно 0, это означает, что такого заместителя в структуре нет. Например, $-A-(R)_0$ означает, что структура на самом деле представляет собой $-A$.

Когда заместитель отсутствует, это означает, что такого заместителя нет. Например, когда X в A-X отсутствует, структура фактически представляет собой A.

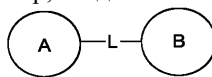
Когда одна из переменных выбрана из одинарной связи, это означает, что две группы, которые она связывает, связаны напрямую. Например, если L в A-L-Z представляет собой одинарную связь, это означает, что структура на самом деле представляет собой A-Z.

Когда связь заместителя перекрестно сшита с одним или более атомами в кольце, заместитель может быть связан с любым атомом в кольце. Например, структурная единица

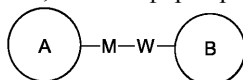


означает, что замещение заместителем R может происходить в любом одном положении на циклогексиле или циклогексадиениле. Когда не указано, каким атомом указанный заместитель соединен с замещаемой группой, заместитель может быть соединен посредством любого атома группы. Например, пиридинил в качестве заместителя может быть соединен с группой, подлежащей замещению, через любой атом углерода на пиридиновом кольце.

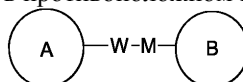
Когда указанная связывающая группа не указывает направление для связывания, направление для связывания является произвольным. Например, когда связывающая группа L, содержащаяся в



представляет собой $-M-W-$, $-M-W-$ может либо связывать кольцо A и кольцо B в направлении, аналогичном порядку считывания слева направо, чтобы сформировать




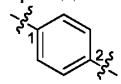
или связывать кольцо A и кольцо B в противоположном направлении, чтобы сформировать




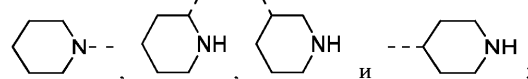
Комбинация связывающей группы, заместителя и/или его варианта является допустимой только в том случае, если комбинация может привести к образованию стабильного соединения.


Если не указано иное, когда группа имеет один или более связываемых сайтов, любой один или более сайтов этой группы могут быть связаны с другими группами химическими связями. Если для химической связи не существует определенного режима связывания, и атомы Н присутствуют в связываемом сайте, количество атомов Н в связываемом сайте соответственно уменьшается в зависимости от количества связанных химических связей, и таким образом образуется группа с соответствующей численной величиной валентности. Химическая связь, которая связывает сайт с другой группой, может быть представлена прямой сплошной связью (/), связью, изображенной прямой пунктирной линией (- - -), или волнистой линией (~). Например, прямая сплошная связь в -ОСН₃ относится к присоединению к

другой группе через атом кислорода в группе; прямая пунктирная связь в  относится к присоединению к другой группе через два конца атома азота в группе;

волнистая линия в  относится к присоединению к другой группе через атомы углерода в положениях 1 и 2 в фенильной группе;

 означает, что любой связываемый сайт на пиперидиле может быть соединен с другой группой через 1 химическую связь, и возможны по меньшей мере 4 режима присоединения

 ;
даже если -N- соединен с атомом Н,

 включает режим присоединения

за исключением того, что, когда 1 химическая связь соединена с сайтом, количество Н в этом сайте соответствующим образом уменьшается на 1 и образуется моновалентный пиперидил.

Если не указано иное, количество атомов в кольце обычно определяют как количество членов в кольце.

Например, "5-7-членное кольцо" относится к "кольцу", в котором от 5 до 7 атомов расположены по кругу.

Если не указано иное, термин "C₁₋₃ алкил" относится к неразветвленной или разветвленной насыщенной углеводородной группе, состоящей из 1-3 атомов углерода. C₁₋₃ алкил включает C₁₋₂ и C₂₋₃ алкил и тому подобное и может быть одновалентным (например, метил), двухвалентным (например, метилен) или поливалентным (например, метенил). Примеры C₁₋₃ алкила включают, но не ограничиваются ими, метил (Me), этил (Et), пропи́л (включая н-пропи́л и изопропи́л) и тому подобное. Если не указано иное, термин "C₁₋₃ алкокси" относится к тем алкильным группам, каждая из которых содержит от 1 до 3 атомов углерода и соединена с остальной частью молекулы через атом кислорода. C₁₋₃ алкокси включает C₁₋₂, C₂₋₃, C₃ и C₂ алкокси и тому подобное. Примеры C₁₋₃ алкокси включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, пропокси (включая н-пропокси и изопропокси) и тому подобное.

Если не указано иное, "C₃₋₅ циклоалкил" относится к насыщенной моноциклической углеводородной группе, состоящей из 3-5 атомов углерода. C₃₋₅ циклоалкил включает C₃₋₄ циклоалкил, C₄₋₅ циклоалкил и тому подобное и может быть одновалентным, двухвалентным или поливалентным. Примеры C₃₋₅ циклоалкила включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и тому подобное.

Если не указано иное, термины "6-членное гетероарильное кольцо" и "6-членный гетероарил" используются в настоящем документе взаимозаменяемо, а термин "6-членный гетероарил" относится к моноциклической группе, состоящей из 6 атомов в кольце с сопряженной π-электронной системой, из которых 1, 2, 3 или 4 атома в кольце представляют собой гетероатомы, независимо выбранные из O, S и N, а остальные представляют собой атомы углерода. Атом азота необязательно кватернизирован, а гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окислены (т.е. NO и S(O)_p, где p составляет 1 или 2). 6-членный гетероарил может быть соединен с остальной частью молекулы через гетероатом или атом углерода. Примеры 6-членного гетероарила включают, но не ограничиваются ими, пиридинил (включая 2-пиридинил, 3-пиридинил, 4-пиридинил и т.д.), пиазинил или пиримидинил (включая 2-пиримидинил, 4-пиримидинил и т.д.).

Термин "последующая обработка" означает, что гидрохлорид или трифторацетат соединения согласно настоящему изобретению растворяют в органическом растворителе, таком как этилацетат или дихлорметан, промывают 1 н. раствором бикарбоната натрия и подвергают концентрированию органической фазы, чтобы можно было получить свободное состояние соединения. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены различными синтетическими способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая конкретные варианты реализации, перечисленные ниже, варианты реализации, образованные их комбинациями с другими химическими способами синтеза, и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники. Предпочтительные варианты осуществления включают, но не ограничиваются ими, примеры настоящего изобретения.

Растворители, применяемые в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными. В настоящем описании используются следующие сокращения: аq для воды; экв. для эквивалента; ДХМ для дихлорметана; РЕ для петролейного эфира; ДМФА для N,N-диметилформамида; ДМСО для диметилсульфоксида; EtOAc для этилацетата; EtOH для этанола; MeOH для метанола; CBz для бензилоксикарбонила, защитной группы амина; BOC для трет-бутилоксикарбонила, защитной группы амина; КТ для комнатной температуры; O/N для "в течение ночи"; ТГФ для тетрагидрофурана; Boc₂O для ди-трет-бутилдикарбоната; TFA для трифторуксусной кислоты; DIPEA для диизопропилэтиламина; Тпл для температуры плавления; Pd(dppf)Cl₂ для комплекса [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II); и Pd(dppf)Cl₂CH₂Cl₂ для комплекса [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) с дихлорметаном.

Структуры соединений настоящего изобретения могут быть подтверждены обычными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, и если настоящее изобретение относится к абсолютной конфигурации соединения, абсолютная конфигурация может быть подтверждена с помощью обычных технологий в данной области техники. Например, в методе рентгеновской дифракции монокристаллов (SXRD) данные об интенсивности дифракции выращенного монокристалла собирают с помощью венчурного дифрактометра Bruker D8, источником света является излучение CuK α , а режим сканирования представляет собой ϕ/θ сканирование; после сбора соответствующих данных дополнительно используется прямой метод (Shelxs97) для анализа кристаллической структуры, и, таким образом, абсолютная конфигурация может быть подтверждена. Соединения названы в соответствии с общепринятыми правилами номенклатуры в данной области техники или с использованием программного обеспечения ChemDraw®, а для коммерчески доступных соединений приведены названия по каталогам поставщиков.

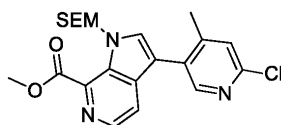
Краткое описание графических материалов

На фигуре показан эксперимент по спленомегалии у мышей.

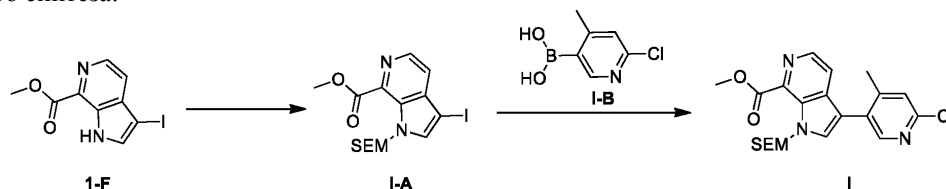
Подробное описание

Настоящее изобретение подробно описано ниже посредством примеров. Однако это никоим образом не ограничивает объем настоящего изобретения. Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано в настоящем документе, а также раскрыты конкретные примеры, специалистам в данной области техники будет понятно, что в конкретные примеры могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

Промежуточное соединение I



Способ синтеза:



Стадия 1: синтез соединения I-A.

Соединение 1-F (1 г, 3,31 ммоль, 1 экв.) растворяли в тетрагидрофуране (10 мл). Реакционный раствор охлаждали до 0°C, после чего добавляли гидрид натрия (158,90 мг, 3,97 ммоль, 60% чистота, 1,2 экв.).

Реакционный раствор перемешивали при 0°C в течение 0,5 ч. Затем добавляли (2-(хлорметокси)этил)триметилсилан (717,51 мг, 4,30 ммоль, 761,69 мкл, 1,3 экв.). Реакционный раствор перемешивали при 20°C в течение 1 ч. Реакционный раствор выливали в воду (20 мл) под небольшим потоком азота и гасили при перемешивании. Добавляли этилацетат (40 мл) для экстракции.

Органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, сушили и фильтровали с получением промежуточного соединения I-A.

MS m/z: 432,9 [M+H]⁺.

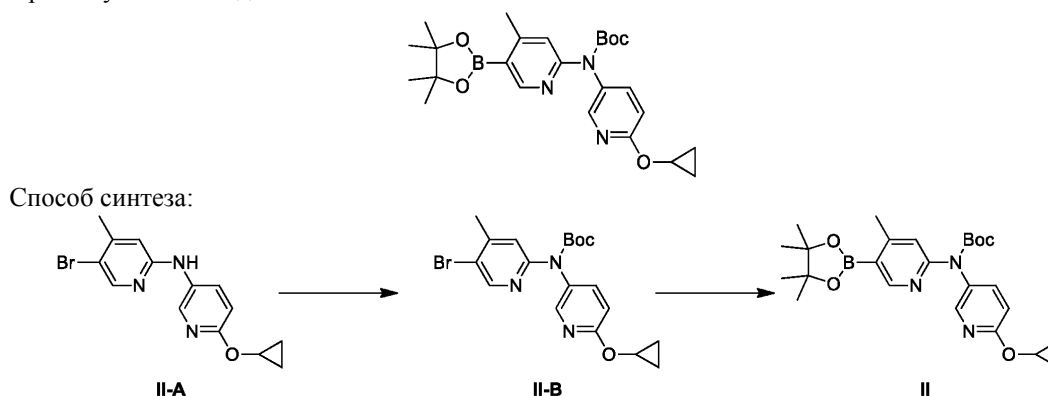
Стадия 2: синтез соединения I.

Соединение I-A (1 г, 2,31 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (10 мл) и воде (1 мл) и добавляли соединение I-B (495,54 мг, 2,89 ммоль), Pd(dppf)Cl₂ (169,25 мг, 231,31 мкмоль) и фосфат калия (1,47 г, 6,94 ммоль). Реакционный раствор барботировали азотом в течение 1 мин и помещали в микроволновой реактор при 60°C на 45 мин (3 серии подавали параллельно). После смешивания 3 реакционных растворов добавляли воду (50 мл) и этилацетат (100 мл). Проводили разделение жидкости. Органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт отделяли с помощью колоночной хроматографии (петролейный эфир:этилацетат = 10:1-4:1), в результате чего получали соединение I.

MS m/z: 432,1 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8,40 (d, J=5,3 Гц, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,47 (d, J=5,3 Гц, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 5,79 (s, 2H), 4,08 (s, 3H), 3,35 - 3,26 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 0,84 - 0,77 (m, 2H), 0,09 (s, 9H).

Промежуточное соединение II



Стадия 1: синтез соединения II-B.

Соединение II-A (200 мг, 624,64 мкмоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) и добавляли Boc₂O (272,65 мг, 1,25 ммоль, 287,00 мкл) и 4-диметиламинопиридин (38,16 мг, 312,32 мкмоль). Реакционный раствор перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который отделяли колоночной хроматографией (этилацетат: петролейный эфир = 0%-5%-10%) с получением соединения II-B.

MS m/z: 420,1 [M+H]⁺.

Стадия 2: Синтез соединения II.

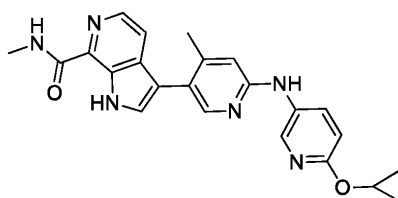
Соединение II-B (110 мг, 261,72 мкмоль) растворяли в 1,4-диоксане (2 мл) и добавляли бис(пинаколато)дибор (73,11 мг, 287,89 мкмоль) и ацетат калия (51,37 мг, 523,44 мкмоль). После того, как реакционную систему барботировали азотом в течение 30 с, добавляли Pd(dppf)Cl₂CH₂Cl₂ (21,37 мг, 26,17 мкмоль). Реакционную систему барботировали азотом в течение 30 с, а затем реакционный раствор помещали для взаимодействия в микроволновой реактор при 130°C в течение 2 часов.

Реакционный раствор фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который отделяли колоночной хроматографией (этилацетат:петролейный эфир = 0%-10%) с получением промежуточного соединения II.

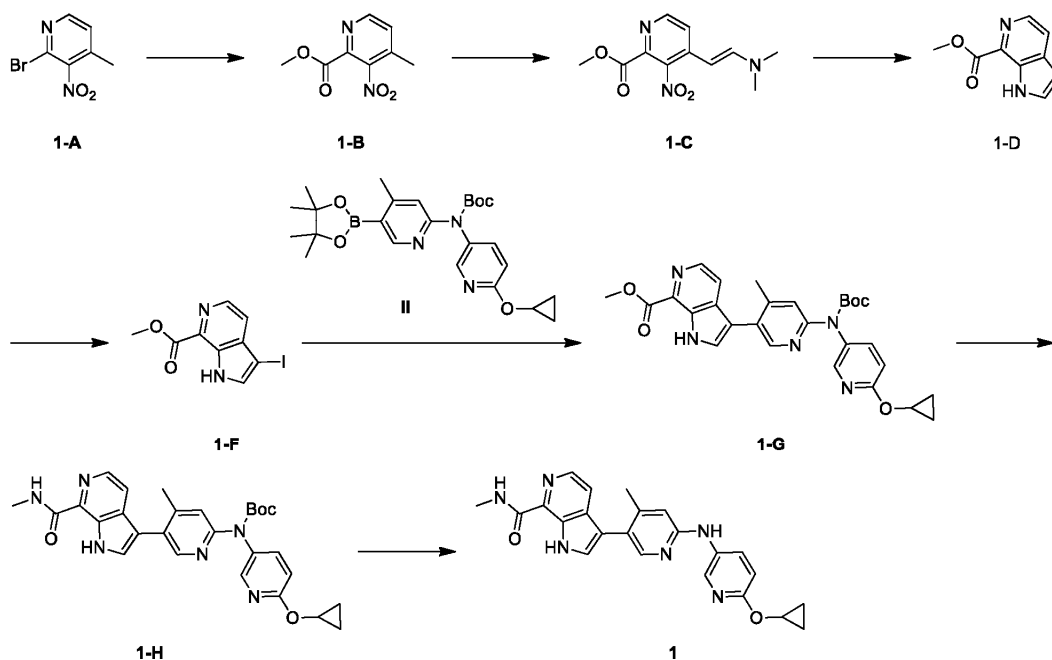
MS m/z: 468,3 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8,59 (s, 1H), 8,03 (d, J=2,5 Гц, 1H), 7,50 (dd, J=2,8, 8,8 Гц, 1H), 7,41 (s, 1H), 6,77 (d, J=8,8 Гц, 1H), 4,29 - 4,07 (m, 1H), 2,54 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,32 (s, 12H), 0,81-0,76 (m, 4H).

Пример 1.



Способ синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 1-B

Соединение 1-A (700 мг, 3,23 ммоль), Pd(dppf)Cl₂ (236,01 мг, 322,55 мкмоль) и триэтиламин (1,63 г, 16,13 ммоль) смешивали в метаноле (3 мл) и N,N-диметилформамиде (30 мл). Реакционный раствор перемешивали при 80°C в течение 12 ч в атмосфере CO (50 psi (~3,44 бар)). После фильтрации реакционного раствора через целит добавляли воду (100 мл). Затем смесь экстрагировали дихлорметаном (250 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, в результате чего получали неочищенный продукт, который разделяли с помощью колоночной хроматографии (тетрагидрофуран:петролейный эфир = 0%-10%-25%), в результате чего получали соединение 1-B. MS m/z: 196,9 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 1-C.

Соединение 1-B (30 мг, 152,94 мкмоль) и N,N-диметилформамид диметилацеталь (448,50 мг, 3,76 ммоль) смешивали в N,N-диметилформамиде (2 мл), и смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который отделяли с помощью колоночной хроматографии (петролейный эфир/этилацетат = 1:1), в результате чего получали соединение 1-C.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8,31 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,36 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,23 (d, J=13,1 Гц, 1H), 4,97 (d, J=13,6 Гц, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,00 (s, 6H).

Стадия 3: синтез соединения 1-D.

Соединение 1-C (330 мг, 1,31 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (10 мл). Добавляли порошок железа (733,52 мг, 13,13 ммоль), и смесь перемешивали при 70°C в течение 5 ч. Реакционный раствор фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта, который разделяли посредством колоночной хроматографии (тетрагидрофуран:петролейный эфир = 0%-50%), в результате чего получали соединение 1-D.

MS m/z: 176,8 [M+H]⁺.

Стадия 4: синтез соединения 1-F.

Соединение 1-D (60 мг, 340,58 мкмоль) и N-йодсукцинимид (91,95 мг, 408,69 мкмоль) растворяли в N,N-диметилформамиде (6 мл), и смесь перемешивали при 35°C в течение 1 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который разделяли с помощью колоночной хроматографии (тетрагидрофуран:петролейный эфир = 0%-50%), в результате чего получали соединение 1-F.

MS m/z: 302,9 [M+H]⁺.

Стадия 5: синтез соединения 1-G.

Соединение 1-F (50 мг, 165,53 мкмоль), промежуточное соединение II (77,36 мг, 165,53 мкмоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) (19,13 мг, 16,55 мкмоль) и карбонат натрия (35,09 мг, 331,05 мкмоль) растворяли в диоксане (2,5 мл) и воде (0,25 мл). Реакционный раствор продували N₂ в течение примерно 30 с и перемешивали при микроволновом излучении при 100°C в течение 30 мин. В реакционный раствор добавляли воду (50 мл). Смесь экстрагировали дихлорметаном (100 мл) и сушили над безводным сульфатом натрия, и осушитель удаляли фильтрованием. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который отделяли с помощью колоночной хро-

матографии (тетрагидрофуран:петролейный эфир = 0%-25%-50%) с получением соединения 1-G.

Стадия 6: синтез соединения 1-H.

Соединение 1-G (30 мг, 58,19 мкмоль) растворяли в растворе метиламина в этаноле (20 мл, 33% по массе), и полученную смесь перемешивали при 45°C в течение 2 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который отделяли колоночной хроматографией (этилацетат:петролейный эфир = 0%-10%-25%) с получением соединения 1-H.

MS m/z: 515,1 [M+H]⁺.

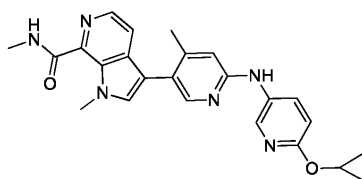
Стадия 7: синтез гидрохлорида соединения 1.

Соединение 1-H (12 мг, 23,32 мкмоль) смешивали с этилацетатом (4 мл) и гидрохлоридом в этилацетате (4 М, 20 мл), и смесь перемешивали при 18°C в течение 12 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который разделяли с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HCl, ацетонитрил), в результате чего получали гидрохлорид соединения 1.

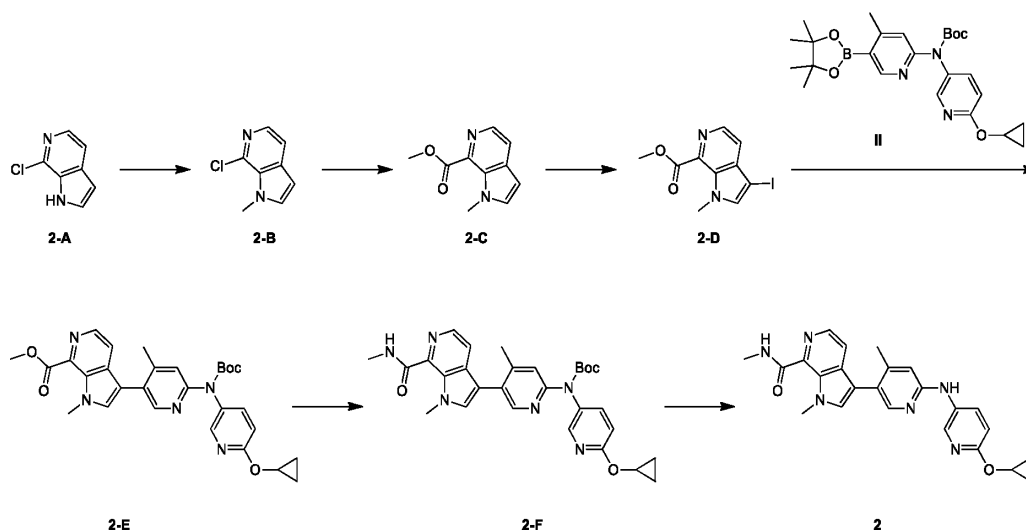
MS m/z: 415,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,53 (d, J=2,0 Гц, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,38 (d, J=6,0 Гц, 1H), 8,21-8,13 (m, 2H), 8,02 (s, 1H), 7,46 (d, J=9,0 Гц, 1H), 7,28 (s, 1H), 4,41-4,30 (m, 1H), 3,15 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 0,99-0,93 (m, 2H), 0,92-0,87 (m, 2H).

Пример 2.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 2-B.

NaH (314,56 мг, 7,86 ммоль, 60% по массе) добавляли к раствору 2-A (1 г, 6,55 ммоль) в ТГФ (30 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин. Затем добавляли йодметан (3,44 г, 24,24 ммоль, 1,51 мл) и реакционный раствор перемешивали при 0°C в течение еще 1 ч. После завершения реакции добавляли 5 мл воды, чтобы остановить реакцию. Полученную смесь разбавляли водой (50 мл), экстрагировали этилацетатом (50 мл × 3), промывали насыщенным солевым раствором (50 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали для удаления осушителя и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии (0%-20% этилацетат/петролейный эфир), в результате чего получали соединение 2-B. MS m/z: 166,9 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 7,95 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,42 (d, J=5,4 Гц, 1H), 7,16 (d, J=3,1 Гц, 1H), 6,49 (d, J=3,1 Гц, 1H), 4,17 (s, 3H).

Стадия 2: Синтез соединения 2-C.

Раствор соединения 2-B (500 мг, 3,00 ммоль), TEA (1,26 г, 12,45 ммоль, 1,73 мл) и Pd(dppf)Cl₂CH₂Cl₂ (122,54 мг, 150,05 мкмоль) в толуоле (40 мл) и метаноле (40 мл) перемешивали в атмосфере монооксида углерода (4 МПа) при температуре 110°C в течение 17 ч. После завершения реакции смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-30% тетрагидрофуран/петролейный эфир), в результате

чего получали соединение 2-С.

MS m/z: 190,9 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8,30 (d, J=5,0 Гц, 1H), 7,66 (d, J=5,3 Гц, 1H), 7,22 (d, J=3,0 Гц, 1H), 6,57 (d, J=3,0 Гц, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,97 (s, 3H).

Стадия 3: синтез соединения 2-D.

Раствор N-йодсукцинимида (567,78 мг, 2,52 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли к раствору 2-С (400 мг, 2,10 ммоль) в ДМФА (10 мл), и реакционный раствор перемешивали при 20-30°C в течение 2 ч. После завершения реакции добавляли 5 мл воды, чтобы остановить реакцию. Полученную смесь разбавляли водой (50 мл), экстрагировали этилацетатом (50 мл × 3), промывали насыщенным солевым раствором (50 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали с удалением осушителя и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии (0%-20% тетрагидрофуран/петролейный эфир), в результате чего получали соединение 2-D. MS m/z: 316,9 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ = 8,39 (d, J=5,3 Гц, 1H), 7,51 (d, J=5,3 Гц, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,99 (s, 3H).

Стадия 4: синтез соединения 2-E.

В атмосфере N₂ смесь соединения 2-D (150 мг, 474,54 мкмоль), промежуточного соединения II (443,57 мг, 949,08 мкмоль), тетракис(трифенилфосфин)палладия(0) и Na₂CO₃ (100,59 мг, 949,08 мкмоль) в диоксане (10 мл) и воде (1 мл) перемешивали при 85-90°C в течение 12 ч. После завершения реакции добавляли 5 мл воды, чтобы остановить реакцию. Смесь разбавляли водой (20 мл), экстрагировали этилацетатом (20 мл × 3), промывали насыщенным солевым раствором (20 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали с удалением осушителя и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0%-50% тетрагидрофуран/петролейный эфир), в результате чего получали соединение 2-E.

MS m/z: 530,4 [M+H]⁺.

Стадия 5: синтез соединения 2-F.

Соединение 2-F получали тем же способом, как и соединение 1-Н в примере 1, за исключением соответствующего исходного материала.

MS m/z: 529,3 [M+H]⁺.

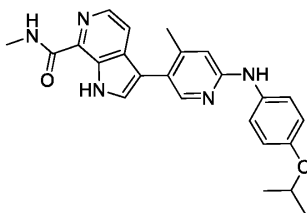
Стадия 6: синтез гидрохлорида соединения 2.

Раствор соединения 2-F (100 мг, 189,18 мкмоль) в соляной кислоте/этилацетате (4 М, 5 мл) и MeOH (2 мл) перемешивали при 40°C в течение 12 ч. После завершения реакции смесь фильтровали с получением продукта, который сушили, в результате чего получали гидрохлорид соединения 2.

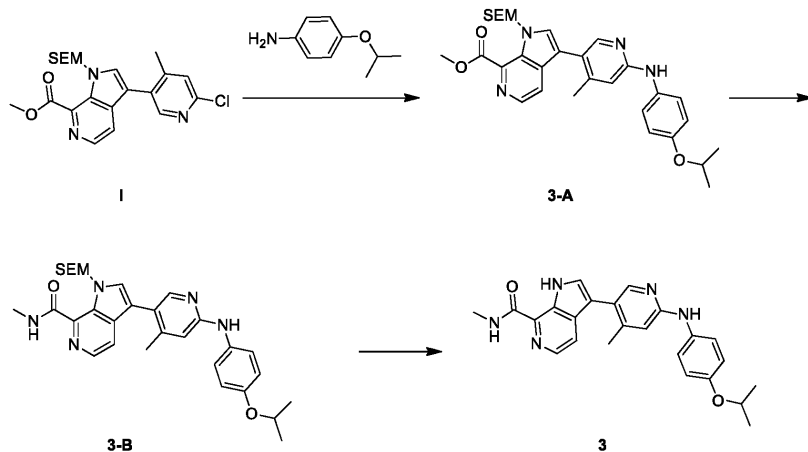
MS m/z: 429,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,49 (d, J=2,3 Гц, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,32 (d, J=6,5 Гц, 1H), 8,13 - 8,06 (m, 2H), 7,98 (s, 1H), 7,39 (d, J=9,0 Гц, 1H), 7,24 (s, 1H), 4,38 - 4,25 (m, 1H), 4,13 (s, 3H), 3,13 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 0,98 - 0,80 (m, 4H).

Пример 3.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 3-А.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 4-изопропоксианилин (38,50 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% этилацетат/петролейный эфир), в результате чего получали соединение 3-А.

MS m/z: 547,3 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 3-В.

3-А (85 мг, 155,47 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, чистота 33%) в этаноле.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 3-В.

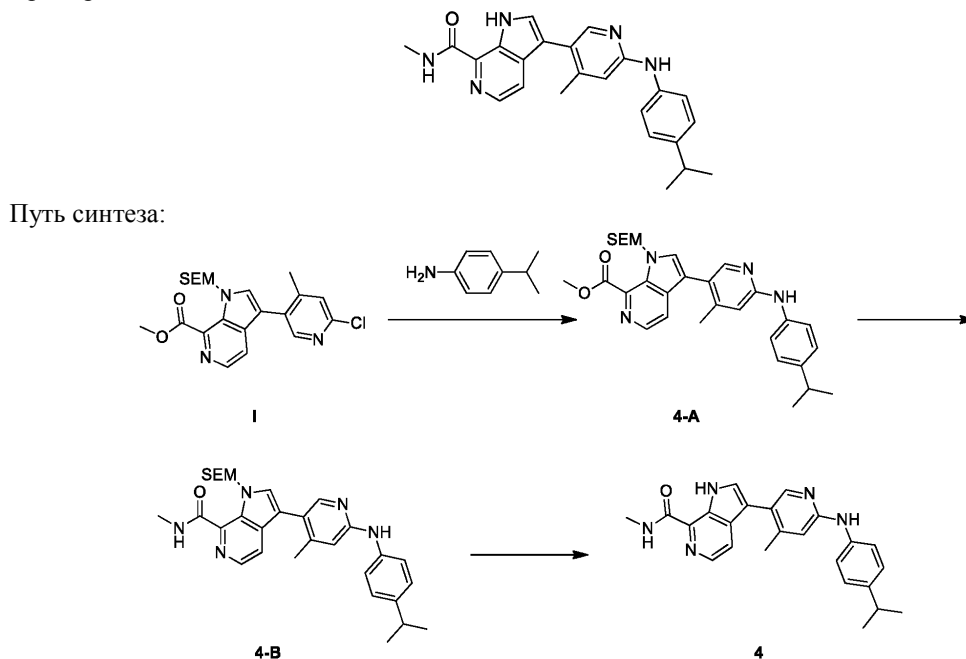
MS m/z: 546,3 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 3.

К раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 10 мл) в тетрагидрофуране добавляли соединение 3-В (85 мг, 155,47 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (70 мг, 168,48 мкмоль) растворяли в этилацетате (10 мл) при 10-20°C и добавляли HCl/EtOAc (4 М, 421,19 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением гидрохлорида соединения 3. MS m/z: 416,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,37 - 8,30 (m, 2H), 8,09 (d, J=6,3 Гц, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,35 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,10 (d, J=8,8 Гц, 2H), 4,68 (spt, J=6,0 Гц, 1H), 3,12 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 1,36 (d, J=6,0 Гц, 6H).

Пример 4.



Стадия 1: синтез соединения 4-А.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 4-изопропиланилин (34,43 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% этилацетат/петролейный эфир) с получением соединения 4-А. MS m/z: 531,3 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 4-В.

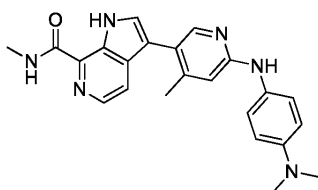
Соединение 4-А (81 мг, 152,62 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, чистота 33%) в этаноле. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 4 ч. После завершения реакции реакци-

онный раствор концентрировали при пониженном давлении, в результате чего получали соединение 4-В.
MS m/z: 530,1 [M+H]⁺.

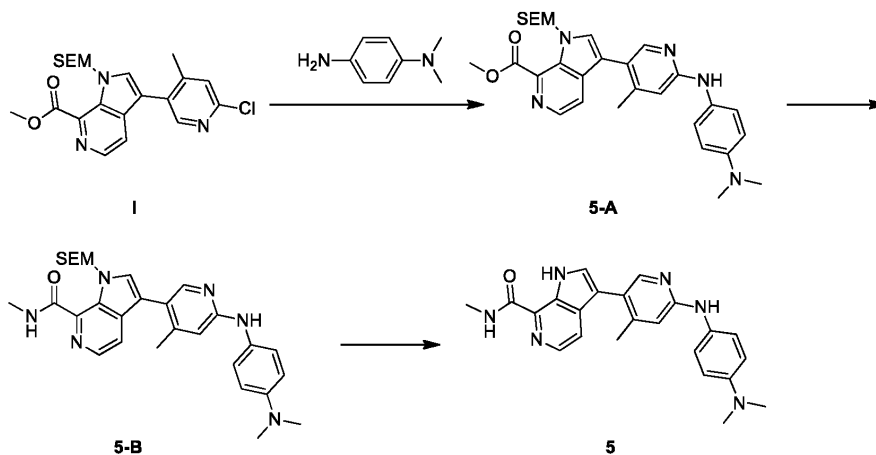
Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 4.

Соединение 4-В (81 мг, 152,90 мкмоль) добавляли к раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 15,45 мл) в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (69 мг, 172,72 мкмоль) растворяли в этилацетате (10 мл) при 10-20°C и добавляли HCl/EtOAc (4 М, 431,80 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением гидрохлорида соединения 4. MS m/z: 400,2 [M+H]⁺; ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,42-8,31 (m, 2H), 8,11 (шир. s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,49 - 7,34 (m, 4H), 7,21 (s, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,06 - 2,96 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 1,30 (d, J=7,0 Гц, 6H).

Пример 5.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 5-А.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), N,N-диметил-р-фенилендиамин (34,68 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% этилацетат/петролейный эфир) с получением соединения 5-А. MS m/z: 532,3 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 5-В.

Соединение 5-А (90 мг, 169,26 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, 33% чистота) в этаноле. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 5-В. MS m/z: 531,1 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 5.

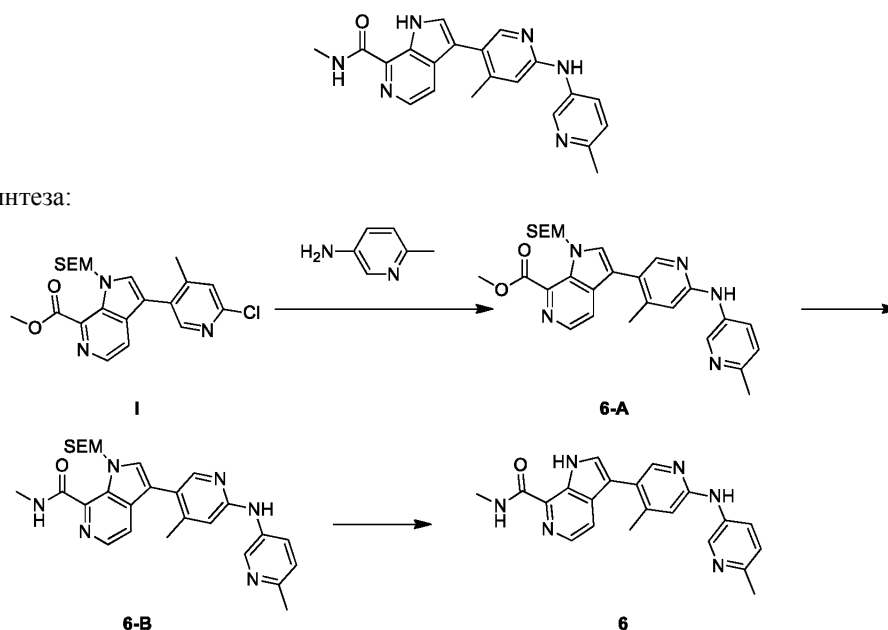
Соединение 5-В (89 мг, 167,69 мкмоль) добавляли к раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 16,95 мл) в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (65 мг, 162,31 мкмоль) растворяли в этилацетате (10 мл) при 10-20°C и добавляли соляную кислоту/этилацетат (4 М, 405,77 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением гидрохлорида соединения 5. MS m/z: 401,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,45 - 8,33 (m, 2H), 8,22 - 8,06 (m, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,84 (шир. d,

$J=8,8$ Гц, 2H), 7,73 - 7,66 (m, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,35 (s, 1H), 3,34 (s, 6H), 3,12 (s, 3H), 2,40 (s, 3H).

Пример 6.

Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 6-А.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 3-амино-6-метилпиридин (27,54 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-60% этилацетат/петролейный эфир) с получением соединения 6-А. MS m/z: 504,2 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 6-В.

Соединение 6-А (80 мг, 158,84 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, чистота 33%) в этаноле. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 6-В.

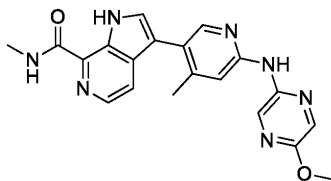
MS m/z: 503,3 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 6

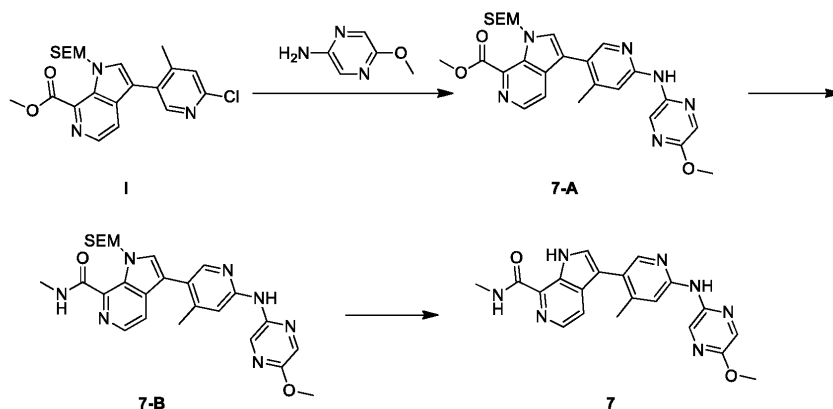
Соединение 6-В (84 мг, 167,10 мкмоль) добавляли к раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 16,89 мл) в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (60 мг, 161,11 мкмоль) растворяли в EtOH (3 мл) при 20-30°C и добавляли HCl (12 М, 14,10 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 20-30°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением гидрохлорида соединения 6. MS m/z: 373,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 9,47 (d, $J=2,3$ Гц, 1H), 8,47 (dd, $J=2,5, 8,8$ Гц, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,33 (d, $J=6,3$ Гц, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,11 (d, $J=6,5$ Гц, 1H), 7,88 (d, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,18 (s, 1H), 3,14 (s, 3H), 2,76 (s, 3H), 2,35 (s, 3H).

Пример 7.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 7-А.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 2-амино-5-метоксипирозин (28,97 мг, 231,49 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% ТГФ/ДХМ) с получением соединения 7-А.

MS m/z: 521,2 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 7-В.

Соединение 7-А (86 мг, 165,18 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, чистота 33%) в этаноле. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 7-В.

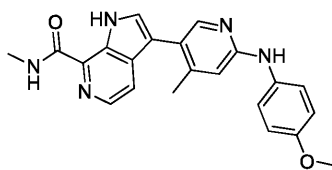
MS m/z: 520,3 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 7

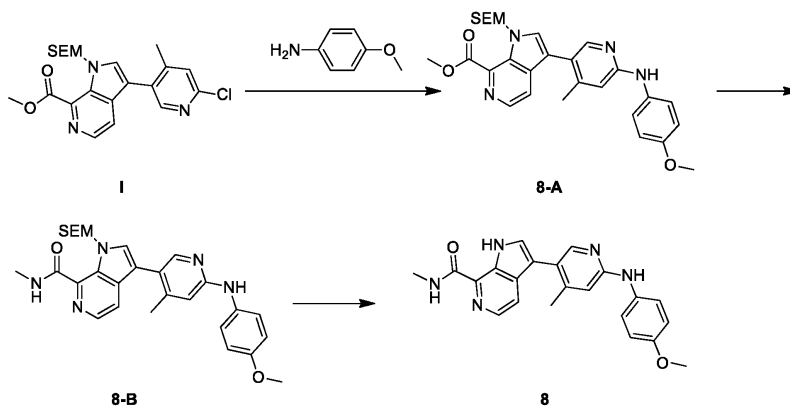
Соединение 7-В (82 мг, 157,79 мкмоль) добавляли к раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 15,95 мл) в тетрагидрофуране. Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (70 мг, 179,76 мкмоль) растворяли в EtOH (3 мл) при 20-30°C и добавляли HCl (12 М, 15,73 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 20-30°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением гидрохлорида соединения 7. MS m/z: 390,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,42 (s, 1H), 8,36 (d, J=6,3 Гц, 1H), 8,24 (d, J=4,6 Гц, 2H), 8,14 (s, 1H), 8,12 (d, J=5,9 Гц, 1H), 7,42 (s, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,13 (s, 3H), 2,46 (s, 3H).

Пример 8.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 8-А.

К раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), р-метоксианилин (31,36 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (150,85 мг, 462,98 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч в атмосфере азота. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% этилацетат/петролейный эфир) с получением соединения 8-А. MS m/z: 519,3 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 8-В.

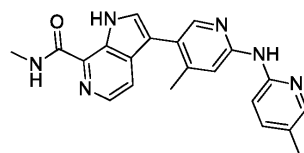
Соединение 8-А (75 мг, 144,60 мкмоль, 1 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) и добавляли раствор метиламина в этаноле (3,5 г, 37,19 ммоль, 5 мл, чистота 33%). Реакционный раствор перемешивали на масляной бане при 45-50°C в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получили соединение 8-В. MS m/z: 518,2 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 8.

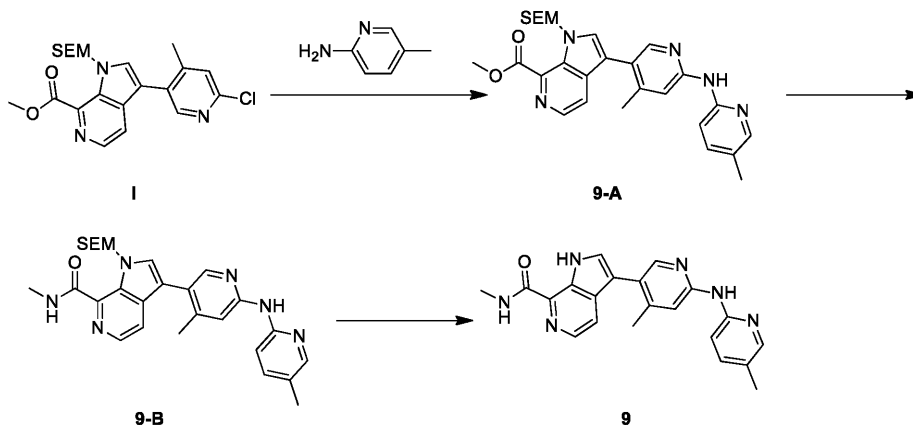
Соединение 8-В (83 мг, 160,33 мкмоль) растворяли в тетрагидрофуране (5 мл) и добавляли безводный этилендиамин (144,53 мг, 2,40 ммоль, 160,95 мкл) и фторид тетрабутиламмония (1 М раствор в тетрагидрофуране, 801,63 мкл). Реакционный раствор перемешивали на масляной бане при наружной температуре 85-90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получили неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Synergi C18 (150 × 30 мм × 4 мкм); подвижная фаза: [0,05% водная соляная кислота-ацетонитрил]; градиент: 12-42%) с получением гидрохлорида соединения 8. MS m/z: 388,3 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,36 (шир. d, J=10,0 Гц, 2H), 8,11 (шир. s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,39 (шир. d, J=8,0 Гц, 2H), 7,17 (s, 1H), 7,13 (шир. d, J=7,8 Гц, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 2,35 (s, 3H).

Пример 9.



Путь синтеза:



Стадия 1: синтез соединения 9-А.

К раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 2-амино-5-метилпиридин (27,54 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (98,28 мг, 301,63 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч в атмосфере азота. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-10% метанол/дихлорметан) с получением соединения 9-А. MS m/z: 504,3 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 9-В.

Соединение 9-А (95 мг, 188,62 мкмоль) растворяли в этаноле (5 мл) и добавляли раствор метиламина в этаноле (3,5 г, 37,19 ммоль, 5 мл, чистота 33%). Реакционный раствор перемешивали на масляной бане при 45-50°C в течение 16 ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получили соединение 9-В.

MS m/z: 503,1 [M+H]⁺.

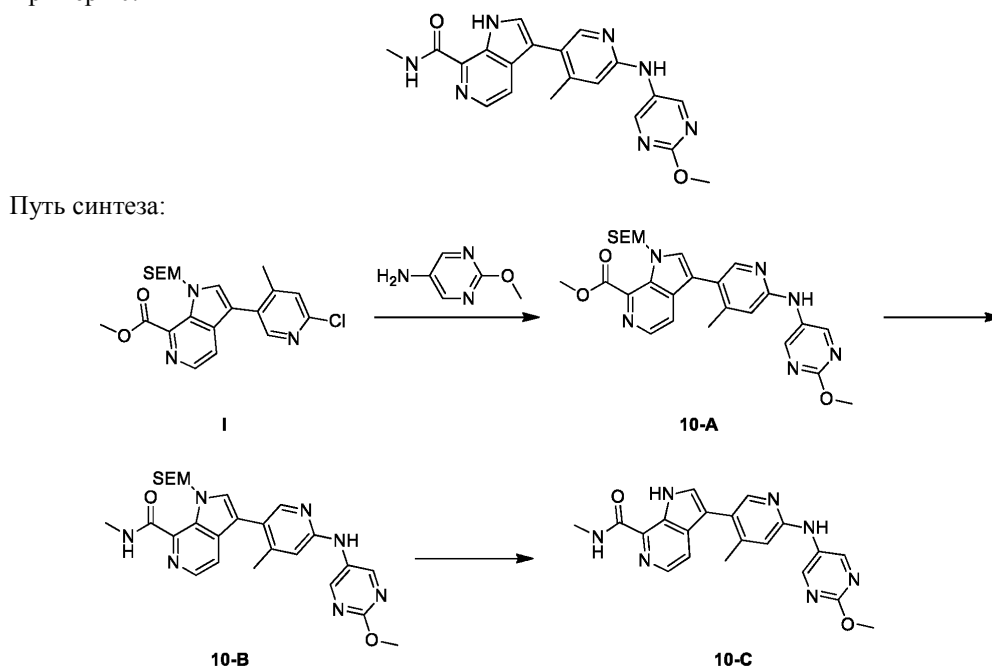
Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 9.

Соединение 9-В (97 мг, 192,96 мкмоль) растворяли в тетрагидрофуране (5 мл) и добавляли безвод-

ный этилендиамин (173,95 мг, 2,89 ммоль, 193,71 мкл) и фторид тетрабутиламмония (1 М раствор в тетрагидрофуране, 964,82 мкл). Реакционный раствор перемешивали на масляной бане при наружной температуре 85-90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получили неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Synergi C18 (150 × 30 мм × 4 мкм); подвижная фаза: [0,05% водная соляная кислота-ацетонитрил]; градиент: 26%-56%) с получением гидрохлорида соединения 9. MS m/z: 373,2 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) = 8,48 (s, 1H), 8,43 (шир. s, 1H), 8,36 (шир. s, 1H), 8,22 (шир. s, 1H), 8,16 (шир. s, 1H), 8,04 (шир. d, J=8,8 Гц, 1H), 7,35 (шир. d, J=8,8 Гц, 1H), 7,31 (s, 1H), 3,14 (s, 3H), 2,41 (s, 6H).

Пример 10.



Стадия 1: синтез соединения 10-A.

В атмосфере азота к раствору диоксана (10 мл) добавляли промежуточное соединение I (100 мг, 231,49 мкмоль), 2-метокси-5-аминопиримидин (31,86 мг, 254,64 мкмоль), карбонат цезия (98,28 мг, 301,63 мкмоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (26,79 мг, 46,30 мкмоль) и трис(дибензилиденацетон)дипалладий (21,20 мг, 23,15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью колоночной хроматографии (0-50% тетрагидрофуран/петролейный эфир) с получением соединения 10-A.

MS m/z: 521,2 [M+H]⁺.

Стадия 2: синтез соединения 10-B.

Соединение 10-A (90 мг, 172,86 мкмоль) добавляли к раствору метиламина (5 мл, 33% чистота) в этаноле. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 2 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 10-B.

MS m/z: 520,3 [M+H]⁺.

Стадия 3: синтез гидрохлорида соединения 10.

К раствору фторида тетрабутиламмония (1 М, 10 мл) в тетрагидрофуране добавляли соединение 10-B (120 мг, 230,92 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и экстрагировали водой (50 мл) и этилацетатом (50 мл). Органическую фазу промывали водой (200 мл, 50 мл×4) и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт (90 мг, 231,12 мкмоль) растворяли в EtOH (3 мл) при 10-20°C и добавляли HCl (12 М, 20,22 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 12 ч. После завершения реакции реакционный раствор фильтровали с получением фильтровального осадка, который сушили в вакууме (45°C, -0,1 МПа, 2 ч) с получением соединения 10. MS m/z: 390,1 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ = 8,78 (s, 2 H), 8,35 (d, J=5,75 Гц, 1 H), 8,12 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,88 (d, J=5,75 Гц, 1H), 7,25 (s, 1H), 4,09 (s, 3H), 3,07 (s, 3H), 2,39 (s, 3H).

Экспериментальный пример 1. Ферментативная ингибирующая активность соединений согласно настоящему изобретению *in vitro*.

Реагенты.

Основной реакционный буфер: 20 мМ гидроксипиперазинэтансульфоновой кислоты (pH 7,5),

10 мМ хлорида магния, 1 мМ EGTA, 0,02% Brij35, 0,02 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,1 мМ Na_2VO_4 , 2 мМ ДТТ, 1% ДМСО.

Необходимые кофакторы были отдельно добавлены в киназную реакцию CSF-1R.

Фермент: CSF-1R, 2,5 нМ.

Обработка.

Тестируемые соединения готовили в растворах с указанными концентрациями в 100% ДМСО, и растворы серийно разводили в ДМСО с использованием Integra Viaflo Assist.

Процедуры.

1. Готовили свежий реакционный буфер для приготовления среды.
2. Все необходимые кофакторы добавляли к реакционному буферу, описанному выше.
3. Киназу добавляли к раствору среды и смесь осторожно встряхивали.
4. Растворы соединений в ДМСО добавляли к киназной реакционной смеси с использованием акустического метода (Echo550; в нанолитровом диапазоне), и систему инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин.
5. К реакционной смеси добавляли ^{33}P -АТФ (удельная активность: 10 мКи/мкл) для инициирования реакции.
6. Смесь инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре.
7. Киназную активность определяли методом связывания с помощью фильтра.
8. Значения IC_{50} киназной активности и кривые получали путем сравнения с другими киназами и группой носителя (ДМСО) с использованием Prism (программное обеспечение GraphPad). Результаты представлены в таблице.

Результаты анализа ферментативной активности соединений согласно настоящему изобретению *in vitro* (IC_{50})

№ соединения	CSF-1R (IC_{50} нМ)	№ соединения	CSF-1R (IC_{50} нМ)
Гидрохлорид соединения 1	1,13	Гидрохлорид соединения 2	26,8
Гидрохлорид соединения 3	34	Гидрохлорид соединения 6	30
Гидрохлорид соединения 7	26	Гидрохлорид соединения 8	10

Вывод: соединение согласно настоящему изобретению оказывает значительное ингибирующее действие на киназу CSF-1R.

Экспериментальный пример 2. Исследование проницаемости (MDR1-MDCK).

Задача.

Двунаправленные проницаемости тестируемых соединений определяли с использованием модели монослойных клеток Caco-2.

Процедуры.

Клетки Caco-2 высевали на 96-луночный планшет Transwell с плотностью 1×10^5 клеток/см². Клетки культивировали в инкубаторе диоксида углерода в течение 28 дней, прежде чем использовать в анализе переноса, и в течение этого периода среду меняли каждые четыре-пять дней.

Буфер представлял собой сбалансированный солевой буфер Хэнка, содержащий 10 мМ HEPES (pH $7,40 \pm 0,05$). Исследуемые соединения разводили до 2 мкМ с помощью буфера. Среду удаляли из планшета и клетки дважды промывали предварительно нагретым буфером для переноса. Растворы для обработки и буфер добавляли в соответствующую лунку планшета для клеток (75 и 250 мкл образцов загружали в апикальную и базолатеральную лунки, соответственно, $n = 2$). Запускали анализ двунаправленного переноса. После загрузки планшеты с клетками инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с 5% CO_2 и при насыщенной влажности в течение 120 мин.

Исходным раствором для обработки был образец T_0 . После загрузки образец смешивали с буфером для переноса (сбалансированный солевой буфер Хэнка) и останавливающим раствором (250 нг/мл раствор толбутамида в ацетонитриле) в определенном соотношении. После 120 мин инкубации конечные образцы собирали с дозирующего и приемного концов и смешивали с буфером для переноса и останавливающим раствором в определенном соотношении.

Все образцы перемешивали на вортексе и центрифугировали при 4000 об/мин при 20°C в течение 20 мин. Супернатант разбавляли сверхчистой водой в соотношении 1:1 (об.:об.) и хранили при $2-8^\circ\text{C}$ для анализа с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС).

Целостность клеточного слоя Caco-2 была проверена с помощью анализа отторжения с использованием желтого люцифера. В каждом планшете с клетками случайным образом отбирали 6 лунок. В апикальный конец добавляли 75 мкл 100 мкМ люцифера желтого, и к базолатеральному концу добавляли 250 мкл буфера для переноса. После 120 мин инкубации отбирали образец 20 мкл на апикальном конце и смешивали с 60 мкл буфера для переноса, и отбирали образец 80 мкл на базолатеральном конце. Относительную единицу флуоресценции (RFU) желтого люцифера в образцах измеряли при $425/528$ нм (длина

волны возбуждения/излучения) с использованием планшетного считывателя M2e.

Обработка данных.

Коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app} , см/с), коэффициент эффлюкса (ER) и процент извлечения раствора рассчитывали по следующим формулам.

$$P_{app} = \frac{V_R}{\text{Площадь} \times \text{Время}} \times \frac{[\text{лек. ср.}]_{\text{конечн.}}}{[\text{лек. ср.}]_{\text{исх. донор}}} = \frac{V_R}{\text{Площадь} \times \text{Время}} \times \frac{C_R}{C_0}$$

$$ER = \frac{P_{app}(B - A)}{P_{app}(A - B)}$$

$$\% \text{ Извлечения р-ра } = \frac{C_R \times V_R + C_D \times V_D}{C_0 \times V_D} \times 100$$

V_R - объем раствора, собранного на приемном конце (0,075 мл для стороны А и 0,25 мл для стороны В); площадь - относительная площадь поверхности клеточного монослоя (0,0804 см²); время - время инкубации (7200 с); C_0 - доля площади пика испытуемого соединения на конце дозирования; V_D - объем конца дозирования (0,075 мл для стороны А и 0,25 мл для стороны В); C_D и C_R - доли площади пика испытуемого соединения на конце дозирования и на приемном конце, соответственно. Процент пропускания желтого люцифера к базолатеральному концу рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ желт. люцифера } = \frac{V_{\text{базолат.}} \times RFU_{\text{базолат.}}}{V_{\text{апик.}} \times RFU_{\text{апик.}} + V_{\text{базолат.}} \times RFU_{\text{базолат.}}} \times 100$$

$RFU_{\text{апик.}}$ и $RFU_{\text{базолат.}}$ - относительные интенсивности флуоресценции желтого люцифера на апикальном и базолатеральном концах, соответственно. $V_{\text{апик.}}$ и $V_{\text{базолат.}}$ - загрузочные объемы на апикальном и базолатеральном концах, соответственно (0,075 мл и 0,25 мл, соответственно).

	Образец	PLX-3397	Гидрохлорид соединения 1
Проницаемость	MDR1: A - B/B - A/ER	0,74/0,55/0,75	14,53/7,08/0,49

Вывод: проницаемость гидрохлорида соединения 1 выше, чем у PLX-3397.

Экспериментальный пример 3. Исследование ингибирования ферментов цитохрома (ингибирование CYP).

Задача.

Для оценки ингибирующего действия тестируемых соединений в отношении микросомальных изоферментов цитохрома P450 печени человека (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4) использовали смешанный маркерный субстрат изоферментов CYP.

Процедуры.

Тестируемые соединения получали в 10 мМ маточных растворах с ДМСО. 178 мкл раствора микросомы печени человека и смеси субстратов добавляли в лунки с неингибирующим контролем (NIC) и тестируемым соединением в реакционном планшете, а затем реакционную смесь помещали на лед. 2 мкл холостого растворителя и рабочего раствора тестируемого соединения отбирали из планшета для разведения и добавляли к реакционному планшету (при конечных концентрациях 0,05-50 мкМ). Реакционный планшет предварительно нагревали на водяной бане при температуре 37±0,2°С в течение 10 мин. 20 мкл раствора кофактора отбирали с помощью рабочей станции для обработки жидкости и добавляли в реакционный планшет для инициирования реакции.

Через 10 мин в реакционный планшет добавляли 400 мкл останавливающего раствора, чтобы остановить реакцию, и реакционный планшет инкубировали на льду в течение 5 мин. Планшет встряхивали в течение 10 мин для гомогенизации растворов, и растворы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Затем супернатант удаляли и добавляли сверхчистую воду в соответствующем соотношении. Площади пиков субстрата и продукта определяли с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС). До проведения анализа образцы хранили при 2-8°С.

Отношение площади пика метаболита, генерируемого маркерным субстратом, к внутреннему стандарту определяли с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС).

Время удерживания аналита и внутреннего стандарта, хроматограммы и интегралы хроматограмм обрабатывали с помощью программного обеспечения Analyst (AB Sciex, Framingham, Массачусеттс, США).

Обработка данных.

Нелинейный регрессионный анализ средней активности в процентах в зависимости от концентрации тестируемых соединений проводили при помощи SigmaPlot (V. 11). Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью трехпараметрического или четырехпараметрического сигмоидального логарифмического

уравнения. Когда процентная активность СУР была выше 50% при наивысшей концентрации (50 мкМ) исследуемого соединения, значение IC_{50} было помечено как ">50 мкМ". Трехпараметрическое сигмоидальное логарифмическое уравнение:

$$y = \frac{\max}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{-hillslope}}$$

Четырехпараметрическое сигмоидальное логарифмическое уравнение:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{-hillslope}}$$

max: максимальная активность фермента,

min: минимальная активность фермента,

x: концентрация исследуемого соединения или ингибитора положительного контроля,

y: активность фермента при соответствующей концентрации; hillslope: наклон,

IC_{50} : половина максимальной подавляющей концентрации.

Четырехпараметрическое сигмоидальное логарифмическое уравнение использовали, когда минимальная активность фермента была в пределах $\pm 10\%$, или в противном случае использовали трехпараметрическое уравнение.

Тестируемое соединение	PLX-3397	Гидрохлорид соединения 1
Ингибирование СУР (IC_{50} , мкМ)	24,0/3,81/8,32/8,77/>35,6	>50/11,6/21,0/>50/28,0
1A2/2C9/2C19/2D6/3A4 (IC_{50} , мкМ)		

Вывод: соединение согласно настоящему изобретению оказывает слабое ингибирующее действие на пять изоферментов СУР и, таким образом, обладает сниженным риском при применении в комбинированной терапии.

Экспериментальный пример 4. Исследование фармакокинетики (ПК)

Задача.

Это исследование было предназначено для изучения фармакокинетики исследуемого соединения в плазме самцов мышей C57BL/6J и крыс SD после внутривенного и перорального введения.

Процедуры.

Животных распределяли в две группы по 3 самца. Были приготовлены составы, содержащие соединения, как указано (носитель: 0,5% МС), то есть прозрачные растворы для внутривенной инъекции и прозрачные или гомогенные суспензии для пероральных составов.

Образцы цельной крови животных отбирали путем пункции яремной вены или из подкожной вены через 5 мин, 15 мин и 30 мин и 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч и 8 ч после введения дозы. Образцы цельной крови добавляли в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт, и центрифугировали при 4°C, 3000 g в течение 15 мин. Супернатант плазмы отбирали и быстро замораживали на сухом льду и хранили в морозильной камере при температуре $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ перед анализом ЖХ-МС/МС.

Обработка данных.

Данные о концентрации лекарственного средства в плазме для соединений обрабатывали в непартментной модели с использованием программного обеспечения для фармакокинетики WinNonlin™ версии 6.3.0 (Pharsight, Mountain View, Калифорния, США). Пиковую концентрацию (C_{max}) и время до пиковой концентрации (T_{max}) и время последней поддающейся количественному определению концентрации получали непосредственно из кривой зависимости концентрации в плазме от времени.

Следующие фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием логарифмически-линейного метода трапеций: плазменный клиренс (CL), объем распределения (Vd), период полувыведения в конечной фазе ($T_{1/2}$), среднее время удерживания соединения от точки 0 до последней временной точки (MRT_{0-last}), среднее время удерживания соединения от точки 0 до бесконечности (MRT_{0-inf}), площадь под кривой концентрация в плазме-время от точки 0 до последней временной точки (AUC_{0-last}), площадь под кривой время-концентрация в плазме от точки 0 до бесконечности (AUC_{0-inf}) и биодоступность (F).

Результаты.

		Мышь		Крыса		
		PLX-3397	Гидрохлорид соединения 1	PLX-3397	Гидрохлорид соединения 1	
ФК	Внутривенно	Доза, мг/кг массы тела	1	1	1	1
		T _{1/2} (ч):	3,33	8,62	1,27	3,4
		Cl (мл/кг/мин)	0,927	0,2	4,64	0,61
		Vd (л/кг)	0,265	0,15	0,613	0,2
		AUC _{0-last} (нМ.ч)	28962	168384	8492	65993
	Перорально	Доза, мг/кг массы тела	10	10	10	3
		C _{max} (нМ)	17200	116798	10700	27409
		T _{max} (ч)	4,0	3,0	1,5	2,0
		AUC _{0-last} (нМ.ч)	130992	1651475	70249	249032
		F (%)	74,1	98	81,0	129

Вывод: соединение согласно настоящему изобретению может значительно улучшать фармакокинетические параметры, такие как период полувыведения, экспозиция и т.п.

Экспериментальный пример 5. Фармакодинамическое исследование *in vivo* гидрохлорида соединения 1 в клетке Ва/F3-TEL-CSF1R трансплантата опухоли в модели голых мышей nu/nu *in situ* Задача

Оценивали эффективность гидрохлорида соединения 1 *in vivo* на модели трансплантата опухоли Ва/F3-TEL-CSF1R *in situ*.

Дизайн.

Клеточная культура: Клетки Ва/F3-TEL-CSF1R культивировали в среде 1640 (Biological Industries) + 10% фетальной бычьей сыворотки (BI) + 1% раствор двойного антибиотика (раствор пенициллина и стрептомицина, Coring, США) при 37°C и 5% CO₂ и пассировали два раза в неделю. Когда насыщение достигло 80%-90% и соответствовало требованию, клетки собирали, подсчитывали и прививали.

Животные: 28 мышей nu/nu, самки, возраст 6-8 недель, 18-22 г, предоставленные Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

Трансплантация опухоли: 0,2 мл суспензии клеток Ва/F3-TEL-CSF1R (2×10⁶ клеток) прививали каждой мыши посредством инъекции в хвостовую вену, и мышей рандомизировали по массе в день 10.

Распределение по группам и режимы дозирования.

Группа	Количество животных	Лечение	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь введения	Частота введения
G0	3	Наивная группа	--	--	--	--
G1	6	Группа, получавшая носитель	--	10	перорально	1 р/сут
G2	6	Контрольная группа (PLX-3397)	10	10	перорально	1 р/сут
G3	6	Гидрохлорид соединения I	1	10	перорально	1 р/сут
G4	6	Гидрохлорид соединения I	3	10	перорально	1 р/сут
G5	6	Гидрохлорид соединения I	10	10	перорально	1 р/сут

Проживание: животных изолировали на карантин и акклиматизацию в течение 7 дней в экспериментальной среде.

Животных содержали в помещениях для животных SPF в независимых клетках с подачей воздуха, и каждая клетка содержала не более 5 животных.

Температура: 20-26°C.

Влажность: 35-75%.

Освещение: 12 ч/12 ч цикл свет/тьма.

Наполнитель из кукурузной сердцевинки, смена один раз в неделю.

Питание: свободный доступ к сухому гранулированному корму, стерилизованному облущением.

Питьевая вода: свободный доступ к питьевой воде, стерилизованной подкислением.

Маркировка: надрезы на ушах.

Распределение по группам: Состояние подкожной опухоли наблюдали каждый день после трансплантации; массу тела и объем опухоли измеряли перед распределением по группам, и рандомизировали мышей в соответствии с этими данными.

Наблюдение: Составление протокола и любые изменения были одобрены Этическим комитетом по благополучию лабораторных животных Precision Preceding Do Co., Ltd. (Хэфэй, Китай). Животных ежедневно контролировали на предмет здоровья и смертности, включая, например, рост опухоли, подвижность, диету, вес, состояние глаз и шерсти, другое аномальное поведение, внешний вид, признаки или другие аномалии. Количество смертей и нежелательных явлений в группах регистрировали в зависимости от количества животных.

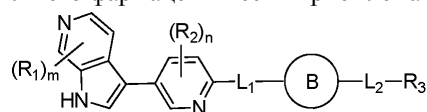
Параметры. Ежедневно измеряли массу тела и наблюдали за выживаемостью животных; в конце исследования (через 4 ч после последней дозы) мышей умерщвляли, селезенку и печень собирали, взвешивали и фотографировали.

Результаты показаны на фиг. 1.

Вывод: В анализе спленомегалии клеток TEL-CSF1R-BaF3 гидрохлорид соединения I показал значительное преимущество при дозе 10 мг/кг массы тела. Высокие, средние и низкие дозы показали явную дозозависимость; указанное соединение показало значительную эффективность при 1 мг/кг массы тела, что было сравнимо с PLX-3397, а статистическая значимость была выше, чем у PLX-3397.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (P) или его фармацевтически приемлемая соль,



(P)

где R₁ выбран из F, Cl, Br, I, C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, -C(=O)-C₁₋₃ алкила и -C(=O)-NH-C₁₋₃ алкила, при этом указанные C₁₋₃ алкил, C₁₋₃ алкокси, -C(=O)-C₁₋₃ алкил и -C(=O)-NH-C₁₋₃ алкил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a;

R₂ выбран из F, Cl, Br, I и C₁₋₃ алкила, причем указанный C₁₋₃ алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b;

R₃ выбран из H, C₁₋₃ алкила и C₃₋₅ циклоалкила, причем указанные C₁₋₃ алкил и C₃₋₅ циклоалкил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c;

кольцо B выбрано из фенила и 6-членного гетероарила, в котором гетероатомы выбраны из O, S, N; m и n каждый независимо выбран из 0, 1 и 2;

L₁ выбран из -N(R_d)-;

L₂ выбран из одинарной связи, -O-, -N(R_d)-C(=O)- и -N(R_d)-C(R_e)(R_f)-;

R_a, R_b и R_c каждый независимо выбран из F, Cl, Br, I и CH₃;

R_d, R_e и R_f каждый независимо выбран из H и CH₃.

2. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где R₁ выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃, при этом указанные CH₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃ необязательно замещены 1, 2 или 3 R_a.

3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.2, где R₁ выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, CHF₂, CF₃, OCH₃, -C(=O)-CH₃ и -C(=O)-NH-CH₃.

4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где R₂ выбран из F, Cl, Br, I и CH₃, при этом указанный CH₃ необязательно замещен 1, 2 или 3 R_b.

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.4, где R₂ выбран из F, Cl, Br, I, CH₃, CH₂F, CHF₂ и CF₃.

6. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где R₃ выбран из H, CH₃, CH(CH₃)₂ и циклопропила, при этом указанные CH₃, OCH₃ и циклопропил необязательно замещены 1, 2 или 3 R_c.

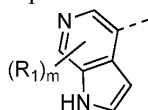
7. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.6, где R₃ выбран из H, CH₃, CF₃, CH(CH₃)₂ и циклопропила.

8. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где L₁ выбран из -NH- и -N(CH₃)-.

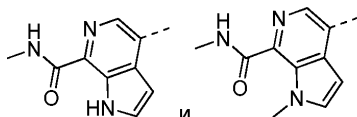
9. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где L₂ выбран из одинарной связи, -O-, -NH-C(=O)-, -NH-CH₂- и -N(CH₃)-CH₂-.

10. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где кольцо B выбрано из фенила, пиридинила, пиримидинила, пиразинила и пиридазинила.

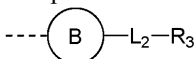
11. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где структурная единица



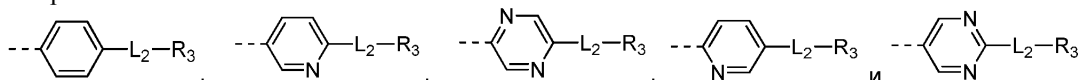
выбрана из



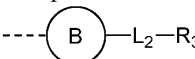
12. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где структурная единица



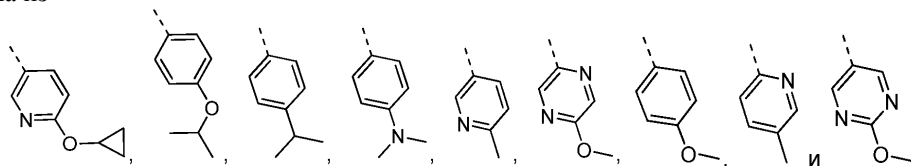
выбрана из



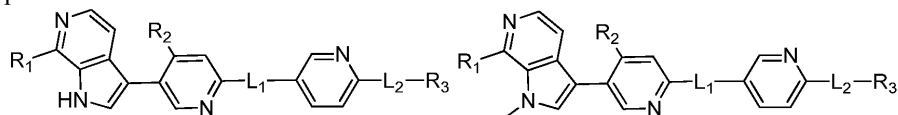
13. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.12, где структурная единица



выбрана из

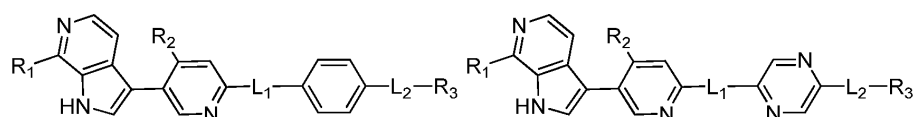


14. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-9, где указанное соединение выбрано из:



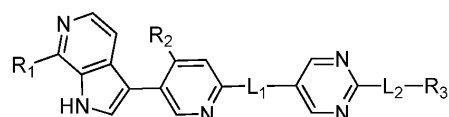
(I-1)

(I-2)



(P-1)

(P-2)



(P-3)

где R₁ охарактеризован в любом из пп.1-3;

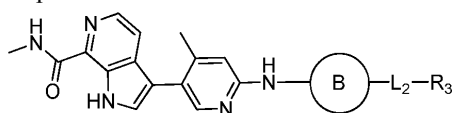
R₂ охарактеризован в любом из пп.1, 4 и 5;

R₃ охарактеризован в любом из пп.1, 6 и 7;

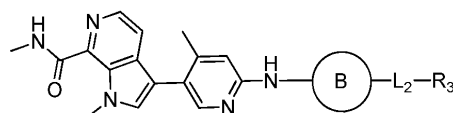
L₁ охарактеризован в п.1 или 8;

L₂ охарактеризован в п.1 или 9.

15. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-9, где указанное соединение выбрано из:

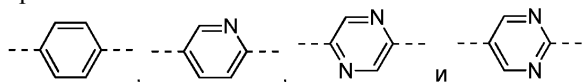


(P-4)



(P-5)

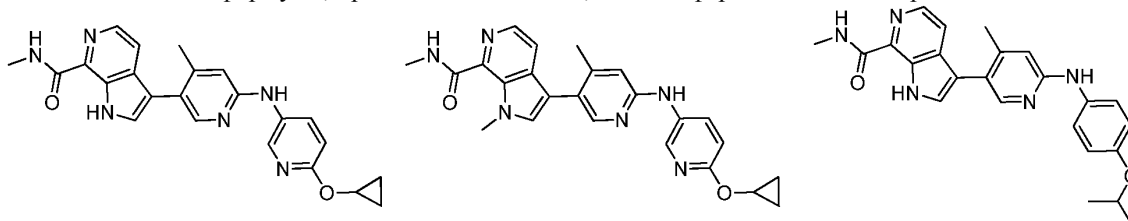
при этом кольцо В выбрано из

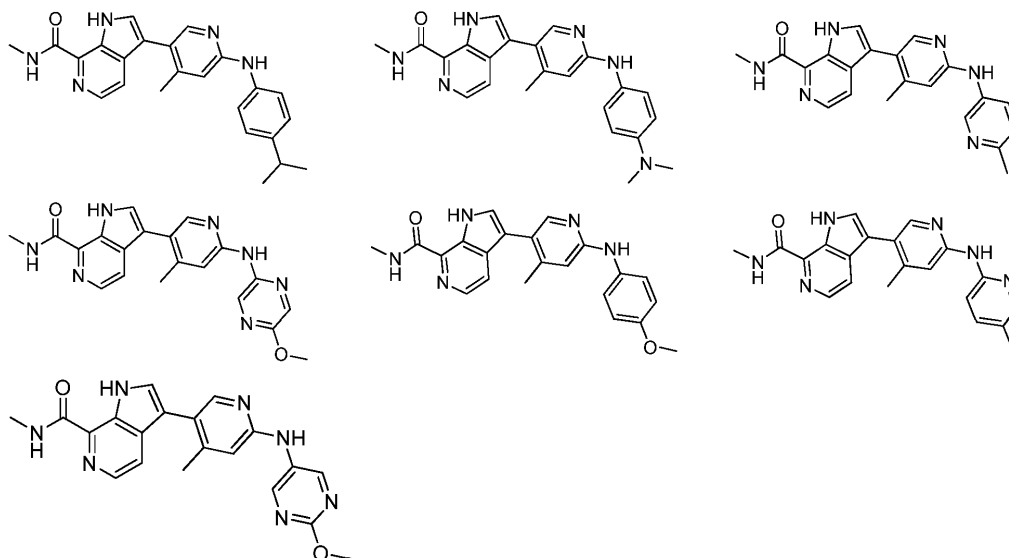


R₃ охарактеризован в любом из пп.1, 6 и 7;

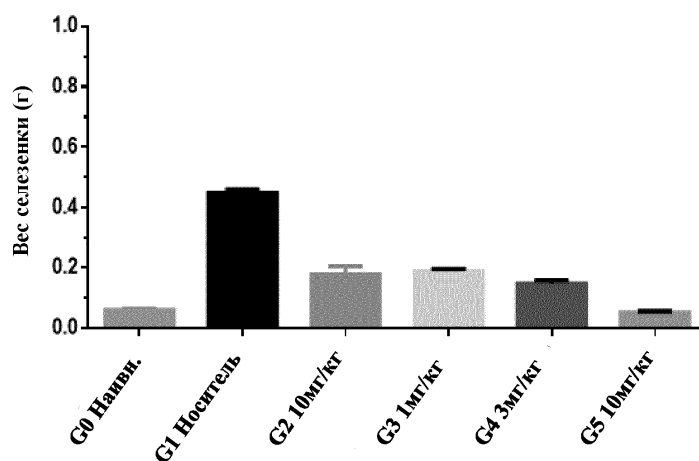
L₂ охарактеризован в п.1 или 9.

16. Соединение формулы, представленной ниже, или его фармацевтически приемлемая соль





17. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-16 для получения лекарственного средства для лечения теносиновидальной гигантоклеточной опухоли.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2