

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 046344

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.03.01

(21) Номер заявки  
202291508

(22) Дата подачи заявки  
2020.11.18

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)  
C07D 261/02 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

---

(54) СОЕДИНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА ROS1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) 201911128342.0; 202010388478.1;  
202010995918.X

(56) WO-A1-2019165967

(32) 2019.11.18; 2020.05.09; 2020.09.21

(33) CN

(43) 2022.07.21

(86) PCT/CN2020/129652

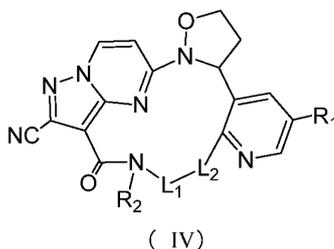
(87) WO 2021/098703 2021.05.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ГУАНЧЖОУ ДЖОЙО ФАРМАТЕК  
КО., ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:  
Ван Цзяньфэй, Ян Гуанвэнь, Сунь  
Цзикуй, Ао Чжихуа, Ли Пэн, Чжан Ян,  
Ли Цю, Ли Цзянь, Чэнь Шухуэй (CN)

(74) Представитель:  
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Раскрыты класс соединений, характеризующихся высокоселективным ингибированием ROS1, и их применение в получении лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с отклоняющейся от нормы экспрессией киназы ROS1. В частности, раскрыты соединения, представленные формулой (IV), и их фармацевтически приемлемая соль.



B1

046344

046344

B1

### Область техники

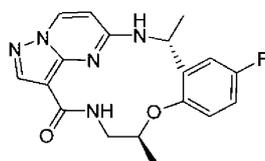
Настоящее изобретение относится к классу соединений, обладающих высокоселективным ингибирующим действием в отношении ROS1, и к их применению в изготовлении лекарственного препарата от заболеваний, связанных с отклоняющейся от нормы экспрессией киназы ROS1. В частности, настоящее изобретение относится к соединениям, представленным формулой (IV), и к их фармацевтически приемлемым солям.

### Уровень техники

Протеинкиназы играют важную роль в организме человека и в значительной мере участвуют в пролиферации, дифференцировке, метаболизме, апоптозе и других процессах различных клеток в организме человека. Онкогенные формы протеинкиназ обильно экспрессируются во многих различных типах опухолей человека и являются весьма чувствительными к ряду специфических ингибиторов киназы. Рецепторная тирозинкиназа с-гос онкоген 1 (ROS1) относится к суперсемейству инсулиновых рецепторов, которая в значительной степени вовлечена в рост, пролиферацию и трансформацию клеток за счет регуляции основных сигнальных путей, таких как RAS/MAPK, PI3K/AKT и STAT3, и может быть вовлечена в развитие и созревание органов. Отклоняющаяся от нормы экспрессия киназы ROS1, такая как точечная мутация гена, сверхэкспрессия и слияние генов, может привести к нарушению регуляции активности киназы, и связана со многими типами рака человека.

Киназа слияния ROS1 теряет внеклеточный домен, но сохраняет трансмембранный и внутриклеточный домены тирозинкиназы. Она может конститутивно активироваться без связывания с лигандом, индуцировать онкогенез и управлять выживанием и пролиферацией опухолевых клеток путем фосфорилирования субстратных белков. Слияние генов CD74-ROS1 впервые было обнаружено у пациентов с НМРЛ в 2007 г., и на сегодняшний день идентифицировано более 14 генов-партнеров. Слияние гена ROS1 является еще одним отчетливым драйверным геном НМРЛ после мутации EGFR и слияния ALK. Положительная величина частоты заболеваемости в Восточной Азии составляет приблизительно 2-3%, а в Европе и Америке - приблизительно 1-2%. В марте 2016 г. на основании данных, полученных только от 50 пациентов (PROFILE 1001), Управлением по контролю качества продуктов и лекарств США (FDA) был одобрен кризотиниб для лечения НМРЛ со слиянием гена ROS1. Кризотиниб является весьма эффективным (частота объективного ответа составляет 72%), но приблизительно через год будет развиваться устойчивость к данному лекарственному средству. Причем метастазы в головной мозг (до 47%) и мутации устойчивости к лекарственному средству в киназе ROS1 (приблизительно от 50 до 60%, с мутацией участка "solvent front" G2032R, на долю которой приходится приблизительно 40%) оказались главными механизмами устойчивости к препарату кризотинибу. У пациентов с метастазами в головной мозг, несмотря на то что препараты энтректиниб (RXDX-101) и лорлатиниб, которые могут проникать в головной мозг, могут приносить дополнительную пользу в отношении PFS, неизбежно возникнут мутации приобретенной устойчивости к лекарственному средству. После неэффективности терапии первой линии или второй линии доступного лекарственного средства не будет. Для пациентов с мутацией участка "solvent front" G2032R, обуславливающей приобретенную устойчивость к лекарственному средству, в настоящее время на рынке нет доступных препаратов направленного действия. Среди ингибиторов ROS1 в рамках клинических исследований только у репотректиниба (TPX-0005), разработанного TP Therapeutics, была доказана эффективность у пациентов с мутациями участка "solvent front" G2032R, обуславливающими устойчивость к лекарственному средству. Тем не менее как и все другие клинические ингибиторы ROS1, репотректиниб (TPX-0005) также является мультикиназным ингибитором, который характеризуется значительным нецелевым побочным действием. В частности, как энтректиниб (RXDX-101), так и репотректиниб (TPX-0005) являются сильными ингибиторами pan-NTRK, и оба характеризуются многочисленными клиническими побочными эффектами, такими как нарушение вкуса, головокружение, парестезия и набор массы тела. Такие побочные эффекты могут быть связаны с нецелевым действием, обусловленным сильным ингибированием Trk-киназы. В отношении пациентов только со слиянием гена ROS1, помимо побочных эффектов, связанных с мишенью, необходимо также не забывать о дополнительных побочных эффектах, вызванных нецелевым действием, что повлияет на терапевтический эффект и ощущения пациента.

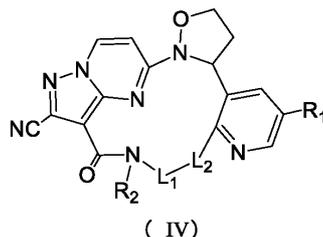
Таким образом, для клинического лечения НМРЛ со слиянием гена ROS1 на сегодняшний день на рынке существует острая необходимость в классе селективных ингибиторов ROS1 с низким уровнем нецелевых побочных эффектов, которые могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и быть эффективными при мутациях устойчивости к лекарственному средству.



TPX-0005  
(репотректиниб)

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к соединению, представленному формулой (IV), его фармацевтически приемлемой соли или его стереоизомеру,



где  $R_1$  представляет собой F;

$R_2$  представляет собой H;

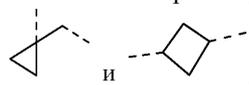
$L_1$  выбран из  $-C_{1-3}$ алкил-,  $-C_{3-6}$ циклоалкил- и  $-C_{3-6}$ циклоалкил- $-C_{1-3}$ алкил-, при этом  $-C_{1-3}$ алкил- обязательно замещен с помощью одного  $R_c$ ;

$L_2$  представляет собой  $-O-$ ;

$R_c$  представляет собой  $CH_3$ .

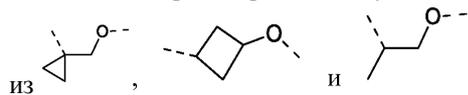
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  $L_1$  выбран из  $-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)CH_2-$ ,  $-циклопропил-CH_2-$  и  $-циклобутил-$ , при этом  $-CH_2-$  и  $-CH(CH_3)CH_2-$  обязательно замещены с помощью одного  $R_c$ , а другие переменные определены в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  $L_1$  выбран из  $-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)CH_2-$ ,



, а другие переменные определены в настоящем изобретении.

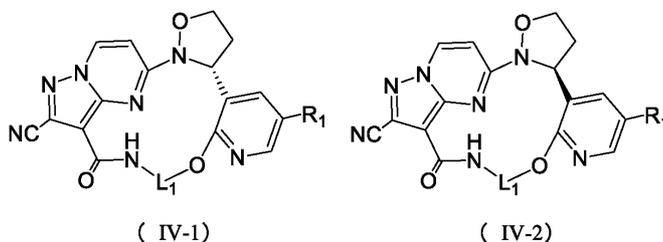
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения структурное звено  $L_1-L_2$  выбрано



, а другие переменные определены в настоящем изобретении.

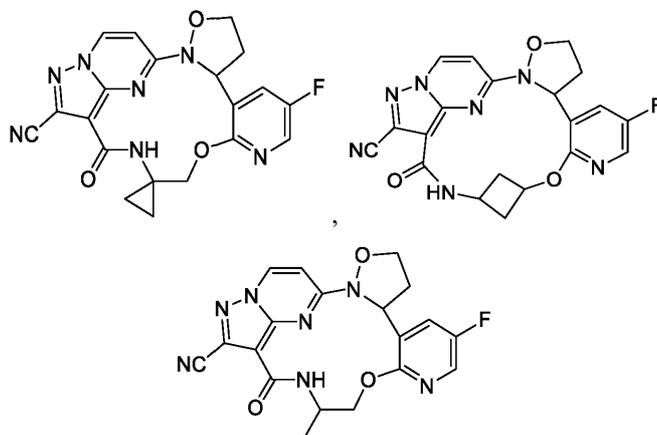
Также существуют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, которые представляют собой любую комбинацию вышеуказанных переменных.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение, его фармацевтически приемлемая соль или его стереоизомер выбраны из

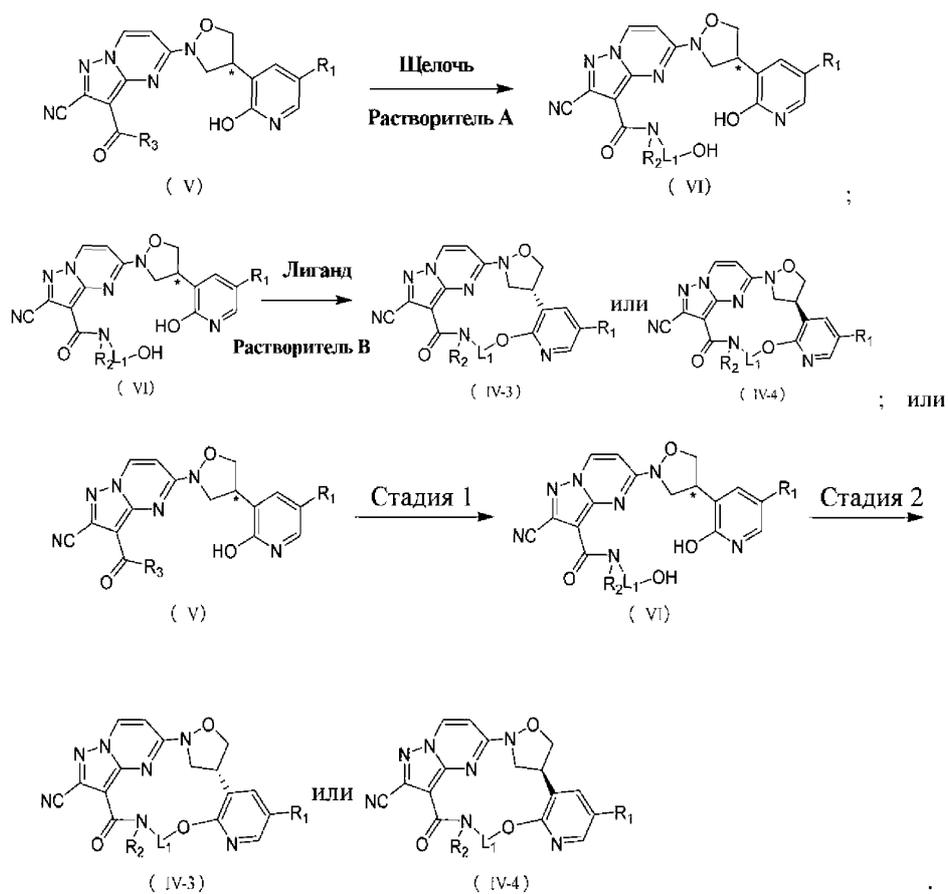


где  $R_1$  и  $L_1$  определены в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному следующей формулой, его фармацевтически приемлемой соли или его стереоизомеру, выбранным из







## Реакционный процесс 1

где  $R_1$  выбран из H, F, Cl, Br, I, OH,  $NH_2$ , CN и  $C_{1-3}$ алкила, необязательно замещенного с помощью 1, 2 или 3  $R_a$ ;

$R_2$  выбран из H и  $C_{1-3}$ алкила, необязательно замещенного с помощью 1, 2 или 3  $R_b$ ;

$R_3$  выбран из OH;

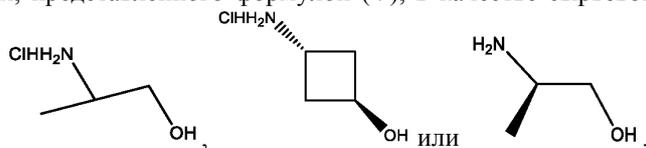
$L_1$  выбран из  $-C_{1-3}$ алкил-,  $-C_{3-6}$ циклоалкил- и  $-C_{3-6}$ циклоалкил- $C_{1-3}$ алкил-, причем  $-C_{1-3}$ алкил-,  $-C_{3-6}$ циклоалкил- и  $-C_{3-6}$ циклоалкил- $C_{1-3}$ алкил- необязательно замещены с помощью 1, 2 или 3  $R_c$ ;

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

атомы углерода со знаком "\*" являются хиральными атомами углерода, которые находятся в форме одного (R)- или (S)-энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

Обеспечивают взаимодействие соединения, представленного формулой (V), в качестве сырьевого

материала стадии 1 в реакционном процессе 1 с

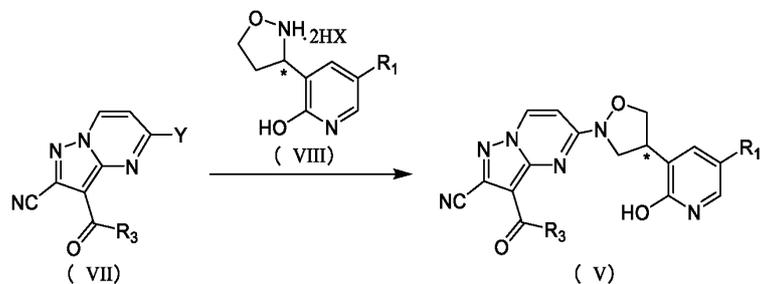


Для обеспечения реакции необходимы подходящие щелочь (например, гидроксид лития, гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат лития, карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат магния, бикарбонат лития, бикарбонат натрия, бикарбонат калия, бикарбонат кальция, бикарбонат магния, формиат натрия, пропионат калия, триметиламин, триэтиламин, пиридин, 4-диметиламинопиридин или N-этилдиизопропиламин), конденсирующее средство (например, дициклогексилкарбодиимид (DCC), бис(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфинхлорид (BOP-Cl), бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PYBOP), карбонилдиимдазол (CDI), диизопропилкарбодиимид (DIC), 2-(7-азабензотриазол)-N,N,N',N'-тетраметилуруния гексафторфосфат (HATU), бензотриазол-N,N,N',N'-тетраметилуруния гексафторфосфат (HBTU) или O-бензотриазол-N,N,N',N'-тетраметилуруния тетрафторборат (TBTU)), подходящий растворитель А (например, N,N-диметилформамид, ацетонитрил, дихлорметан, диметилсульфоксид, N-метилпирролидон или N,N-диметилацетамид) и температура реакционной среды от 20 до 30°C для проведения реакции.

На стадии 2 реакции получают соединение, представленное формулой (IV), из соединения, представленного формулой (VI), при условии наличия лиганда и растворителя. Для обеспечения реакции необходимы лиганд (например, трифенилфосфин, триметилфенилфосфин, трициклогексилфосфин, тритрет-бутилфосфин, трибутилфосфин и диэтилфенилфосфин), щелочной реагент (например, диизопропи-

лазодикарбоксилат или диэтилазодикарбоксилат), подходящий растворитель В (например, толуол, ксилол, диметилловый эфир этиленгликоля, диоксан, тетрагидрофуран, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид и N-метилпирролидон) и температура реакционной среды от 20 до 30°C для проведения реакции.

Соединение, представленное формулой (V), может быть получено согласно общему реакционному процессу, хорошо известному специалистам в данной области техники. Например, соединение, представленное формулой (V), может быть получено согласно следующему реакционному процессу 2:



Реакционный процесс 2

где Y выбран из OTf, OTs и OSO<sub>2</sub>Ph;

X выбран из F, Cl, Br и I;

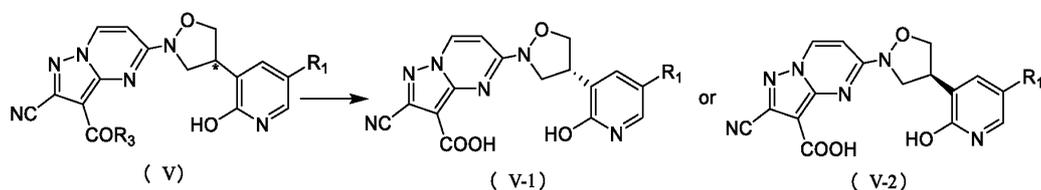
R<sub>3</sub> выбран из OH и O-C<sub>1-3</sub>алкила;

атомы углерода со знаком "\*" являются хиральными атомами углерода, которые находятся в форме одного (R)- или (S)-энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

На данной стадии реакции обеспечивают взаимодействие соединения, представленного формулой (VII), с соединением, представленным формулой (VIII), при условии наличия щелочи и подходящего растворителя. Для обеспечения реакции необходимы щелочь (триэтиламин, пиридин, N-метилморфолин, N,N-диизопропилэтиламин или 4-диметиламинопиридин), подходящий растворитель (например, N,N-диметилформамид, ацетонитрил, дихлорметан, изопропанол, диметилсульфоксид, N-метилпирролидон или N,N-диметилацетамид) и температура реакционной среды от 20 до 50°C для проведения реакции.

Соединение, представленное формулой (V-1), может быть получено согласно общему реакционному процессу, хорошо известному специалистам в данной области техники.

Например, соединение, представленное формулой (V-1), может быть получено согласно следующему реакционному процессу 3:



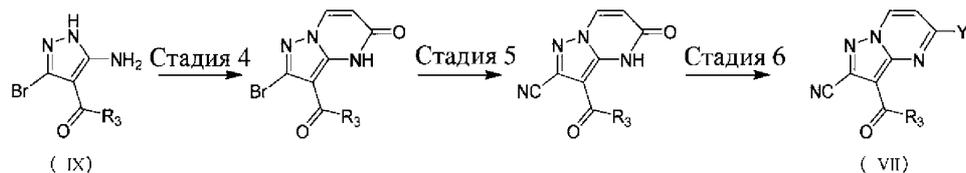
Реакционный процесс 3

где R<sub>3</sub> выбран из O-C<sub>1-3</sub>алкила;

атомы углерода со знаком "\*" являются хиральными атомами углерода, которые находятся в форме одного (R)- или (S)-энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

На данной стадии реакции обеспечивают взаимодействие соединения, представленного формулой (V-1), в подходящей щелочи (например, гидроксидом лития моногидратом) и в подходящем растворителе (например, тетрагидрофуране) при температуре реакционной среды от 20 до 30°C.

Соединение, представленное формулой (VII), может быть получено согласно общему реакционному процессу, хорошо известному специалистам в данной области техники. Например, соединение, представленное формулой (VII), может быть получено согласно следующему реакционному процессу 4:



Реакционный процесс 4

где Y выбран из OTf, OTs и OSO<sub>2</sub>Ph;

R<sub>3</sub> выбран из OH и O-C<sub>1-3</sub>алкила;

на стадии 4 реакции обеспечивают взаимодействие соединения, представленного формулой (IX), с этил-3-этоксикарилатом при условии наличия подходящей щелочи и подходящего растворителя. Для обеспечения реакции необходимы щелочь (например, трет-бутоксид натрия, трет-бутоксид калия, фос-

фат калия или ацетат натрия), подходящий растворитель (например, толуол, диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид или N,N-диметилацетамид) и температура реакционной среды от 110 до 130°C для проведения реакции. На следующей стадии 5 реакции реакцию проводят с использованием цианида меди при условии наличия подходящего растворителя (например, N,N-диметилформамида). На следующей стадии 6 реакции реакцию проводят с использованием электрофильных реагентов (например, трифторметансульфонилхлорида, п-толуолсульфонилхлорида, бензолсульфонилхлорида) в подходящей щелочи (например, триэтиламин) и подходящем растворителе (например, дихлорметане) при температуре реакционной среды от 20 до 30°C.

Технический эффект.

Соединение по настоящему изобретению проявляет высокую ингибирующую активность в отношении киназы, в частности киназы ROS1 и ее мутанта ROS1-G2032R, которая сопоставима с активностью TPX-0005. Тем не менее соединение по настоящему изобретению характеризуется слабой ингибирующей активностью в отношении киназ TtkA и ALK, что показывает высокую селективность, которая значительно лучше селективности TPX-0005. Соединение по настоящему изобретению проявляет высокую ингибирующую активность в отношении клеточной пролиферации на примере слитой с ROS1 линии клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1 и ее мутантной линии клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R. Соединение по настоящему изобретению проявляет слабую ингибирующую активность в отношении линии клеток Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT, и по сравнению с линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1 и линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R, особенно линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R, соединение по настоящему изобретению проявляет значительную ингибирующую селективность. Соединение по настоящему изобретению проявляет отличные фармакокинетические характеристики; соединение по настоящему изобретению характеризуется значительным ингибирующим действием на опухоль.

#### Определения и описание

Если не указано иное, следующие термины и выражения при использовании в данном документе имеют следующие значения. Конкретный термин или выражение при отсутствии точного определения не следует считать неопределенными или неясными, а следует понимать в соответствии с общепринятым значением. Если в данном документе встречается торговое название, то предполагается, что оно относится к соответствующему ему продукту или его активному ингредиенту.

Термин "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе применительно к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями человека и животного без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с обоснованным соотношением польза/риск.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли соединения по настоящему изобретению, которая получена путем обеспечения реакции соединения, содержащего конкретный заместитель по настоящему изобретению с относительно нетоксичными кислотой или основанием. Если соединение по настоящему изобретению содержит относительно кислотную функциональную группу, то соль присоединения основания может быть получена посредством приведения нейтральной формы соединения в контакт с достаточным количеством основания в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания включает соль натрия, калия, кальция, аммония, органического амина или магния или подобные соли. Если соединение по настоящему изобретению содержит относительно основную функциональную группу, то соль присоединения кислоты может быть получена посредством приведения нейтральной формы соединения в контакт с достаточным количеством кислоты в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты включают соль неорганической кислоты, где неорганическая кислота включает, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, азотную кислоту, угольную кислоту, бикарбонат, фосфорную кислоту, моногидрофосфат, дигидрофосфат, серную кислоту, гидросульфат, йодистоводородную кислоту, фосфористую кислоту и т.п.; и соль органической кислоты, где органическая кислота включает, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, изомаляновую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, бензойную кислоту, янтарную кислоту, субериновую кислоту, фумаровую кислоту, молочную кислоту, миндальную кислоту, фталевую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, лимонную кислоту, винную кислоту, метансульфоновую кислоту и т.п.; и соли аминокислоты (такой как аргинин и т.п.), и соль органической кислоты, такой как глюкуроновая кислота и т.п. Определенные конкретные соединения по настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, поэтому могут быть превращены в любую соль присоединения основания или соль присоединения кислоты.

Фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению может быть получена из исходного соединения, которое содержит кислотный или основной фрагмент, традиционным химическим способом. Как правило, такая соль может быть получена путем обеспечения реакции свободной кислотной или основной формы соединения со стехиометрическим количеством соответствующих основания или кислоты в воде или органическом растворителе или их смеси.

Если не указано иное, то предполагается, что термин "изомер" включает геометрический изомер, цис-транс-изомер, стереоизомер, энантиомер, оптический изомер, диастереоизомер и таутомер.

Соединения по настоящему изобретению могут находиться в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. В настоящем изобретении рассматриваются все такие соединения, включая цис- и транс-изомеры, (-)- и (+)-энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереомерные изомеры, (D)-изомеры, (L)-изомеры, а также их рацемические и другие смеси, такие как энантиомерно или диастереомерно обогащенные смеси, все из которых включены в объем настоящего изобретения. В заместителях, таких как алкил, могут присутствовать дополнительные асимметрические атомы углерода. Все такие изомеры и их смеси включены в объем настоящего изобретения.

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" определяется невозможностью свободного вращения двойных связей или одинарных связей атомов углерода, образующих кольцо.

Если не указано иное, термин "диастереоизомер" относится к стереоизомеру, молекула которого содержит два или более хиральных центров, при этом при взаимном расположении таких молекул они не являются зеркальными отражениями.

Если не указано иное, "(+)" относится к правостороннему вращению, "(-)" относится к левостороннему вращению и или "(±)" относится к рацемической смеси.

Если не указано иное, абсолютная конфигурация стереоцентра представлена клиновидной сплошной связью () и клиновидной пунктирной связью (), а относительная конфигурация стереоцентра представлена прямой сплошной связью () и прямой пунктирной связью (); волнистая линия () используется для обозначения клиновидной сплошной связи () или клиновидной пунктирной связи (); или волнистая линия () используется для обозначения прямой сплошной связи () или прямой пунктирной связи ().

Если не указано иное, термины "обогащенный одним изомером", "обогащенный изомерами", "обогащенный одним энантиомером" или "обогащенный энантиомерами" относятся к содержанию одного из изомеров или энантиомеров, составляющему менее 100%, и содержанию изомера или энантиомера, большему или равному 60%, или большему или равному 70%, или большему или равному 80%, или большему или равному 90%, или большему или равному 95%, или большему или равному 96%, или большему или равному 97%, или большему или равному 98%, или большему или равному 99%, или большему или равному 99,5%, или большему или равному 99,6%, или большему или равному 99,7%, или большему или равному 99,8%, или большему или равному 99,9%.

Если не указано иное, термин "избыток изомера" или "энантиомерный избыток" относится к разности значений относительного процентного содержания двух изомеров или двух энантиомеров. Например, если содержание одного изомера или энантиомера составляет 90%, а содержание другого изомера или энантиомера составляет 10%, то избыток изомера или энантиомера (значение ee) составляет 80%.

Оптически активный (R)- и (S)-изомер или D- и L-изомер может быть получен с применением хирального синтеза, или хиральных реагентов, или других традиционных методик. Если нужно получить один вид энантиомера конкретного соединения по настоящему изобретению, то необходимый чистый энантиомер может быть получен путем асимметрического синтеза или дериватизации с помощью хирального вспомогательного вещества, с последующим разделением полученной в результате диастереомерной смеси и отщеплением вспомогательной группы. В качестве альтернативы, если молекула содержит основную функциональную группу (такую как амина) или кислотную функциональную группу (такую как карбоксильная), соединение вступает в реакцию с соответствующими оптически активными кислотой или основанием с образованием соли диастереомерного изомера, которую затем подвергают диастереомерному разделению посредством традиционного способа, известного из уровня техники, с получением чистого энантиомера. Кроме того, разделение энантиомера и диастереоизомера обычно осуществляют с помощью хроматографии с использованием хиральной неподвижной фазы, причем необязательно в сочетании со способом химической дериватизации (например, получение карбамата из амина).

Соединение по настоящему изобретению может содержать неприродное соотношение атомных изотопов при одном или более атомах, которые составляют соединение. Например, соединение может быть мечено радиоактивной меткой в виде радиоактивного изотопа, такого как тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или С-14 ( $^{14}\text{C}$ ). В другом примере дейтерированные лекарственные средства могут быть образованы путем замены водорода тяжелым водородом, причем связь, образованная дейтерием и углеродом, сильнее связи обычного водорода и углерода; по сравнению с недеитерированными лекарственными средствами дейтерированные лекарственные средства обладают такими преимуществами, как менее выраженные токсичные и побочные эффекты, увеличенная стабильность лекарственного средства, повышенная эффективность, пролонгированный биологический период полувыведения лекарственных средств и т.п. Все изотопные варианты соединения по настоящему изобретению независимо от того, являются ли они радиоак-

тивными или нет, включены в объем настоящего изобретения.

Термин "необязательный" или "необязательно" означает, что последующее событие или условие может быть реализовано, но не обязательно, так что термин включает случай, при котором событие или условие реализуется, и случай, при котором событие или условие не реализуется.

Термин "замещенный" означает, что один или более атомов водорода при конкретном атоме замещен(ы) заместителем, в том числе дейтерием и вариантами водорода, при условии, что валентность конкретного атома является нормальной, и замещенное соединение является стабильным. Если заместителем является атом кислорода (т.е. =O), это означает, что два атома водорода являются замещенными. Положения в ароматическом кольце не могут быть замещены кетоном. Термин "необязательно замещенный" означает, что атом может быть замещен или не замещен заместителем, если не указано иное, причем тип и число заместителей могут быть произвольными при условии, что это химически достижимо.

Если любая переменная (такая как R) встречается в составе или структуре соединения больше одного раза, определение переменной в каждом случае является независимым. Таким образом, например, если группа замещена 0-2 R, то данная группа может быть необязательно замещена не более чем двумя R, при этом определение R в каждом случае является независимым. Более того, комбинация заместителя и/или его варианта допускается только тогда, когда такая комбинация приводит к образованию стабильного соединения.

Если число линкерных групп равно 0, как например -(CRR)0-, это означает, что линкерная группа представляет собой одинарную связь.

Если число заместителей равно 0, это значит, что заместитель отсутствует, например, -A(R)0 означает, что структура фактически представляет собой -A.

Если заместитель является вакантным, это значит, что заместитель отсутствует, например, если X является вакантным в A-X, структура A-X фактически представляет собой A.

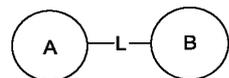
Если одна из переменных выбрана из одинарной связи, это значит, что две группы, соединенные одинарной связью, соединены непосредственно. Например, если L в A-L-Z представляет собой одинарную связь, то структура A-L-Z фактически представляет собой A-Z.

Если связь заместителя может быть перекрестно соединена с двумя или более атомами в кольце, то такой заместитель может быть связан с любым атомом в кольце, например, структурное звено

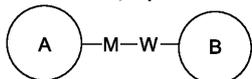


означает, что заместитель R может быть замещен в любом положении в циклогексиле или циклогексадиене. Если в перечисленном заместителе не указано, посредством какого атома он связан с замещаемой группой, такой заместитель может быть связан посредством любого его атома. Например, если пиридил выполняет функцию заместителя, он может быть связан с замещаемой группой посредством любого атома углерода в пиридиновом кольце.

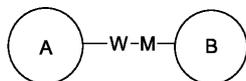
Если в перечисленной линкерной группе не указано направление связывания, то направление связывания является произвольным; например, если линкерная группа L, содержащаяся в



, представляет собой -M-W-, то -M-W- может связывать кольцо A и кольцо B с образованием



в направлении, соответствующем порядку чтения слева направо, и с образованием



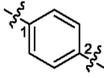
в направлении, противоположном порядку чтения слева направо. Комбинация линкерных групп, заместителей и/или их переменных является допустимой, только если такая комбинация может приводить к образованию стабильного соединения.

Если не указано иное, при содержании в группе одного или более связываемых участков, любой один или более участков группы могут быть связаны с другими группами посредством химических связей. Если тип соединения химической связи не установлен, и в присоединяемом сайте присутствует атом H, число атомов H в указанном сайте будет соответственно уменьшаться на число присоединяемых химических связей, при этом в случае присоединения химической связи группа становится соответствующей валентности. Химическая связь между сайтом и другими группами может быть представлена прямой сплошной связью (—) прямой пунктирной связью (---) или волнистой линией (~~~~).

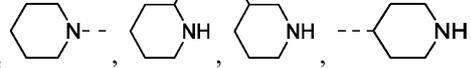
Например,

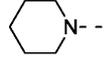
прямая сплошная связь в -OCH<sub>3</sub> означает, что группа связана с другими группами посредством атома кислорода в группе;

прямые пунктирные связи в  означают, что группа связана с другими группами с двух концов от атома азота в группе;

волнистые линии в  означают, что фенильная группа связана с другими группами посредством атомов углерода в положении 1 и положении 2;

 означает, что группа может быть связана с другими группами посредством любых присоединяемых сайтов при пиперидиниле за счет одной химической связи, включая по меньшей мере четыре

типа связывания, в том числе 

Даже если при -N-изображен атом Н,  все равно включает группу с типом связывания , причем в случае присоединения одной химической связи число Н в указанном сайте будет уменьшаться на единицу до соответствующего одновалентного пиперидинила.

Если не указано иное, число атомов в кольце обычно определяется как число членов кольца, например, "5-7-членное кольцо" относится к "кольцу", состоящему из 5-7 атомов, расположенных по кругу.

Термин "защитная группа" включает без ограничения "аминозащитную группу", "гидроксизащитную группу" или "тиозащитную группу". Термин "аминозащитная группа" относится к защитной группе, подходящей для предотвращения побочной реакции по азоту аминогруппы. Иллюстративные аминозащитные группы включают без ограничения формил; ацил, такой как алканоил (например, ацетил, трихлорацетил или трифторацетил); алкоксикарбонил, такой как трет-бутоксикарбонил (Boc); арилметоксикарбонил, такой как бензилоксикарбонил (Cbz) и 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc); арилметил, такой как бензил (Bn), тритил (Tr), 1,1-бис-(4'-метоксифенил)метил; силлил, такой как триметилсиллил (TMS) и трет-бутилдиметилсиллил (TBS), и т.п. Термин "гидроксизащитная группа" относится к защитной группе, подходящей для предотвращения побочной реакции по гидроксигруппе. Иллюстративные гидроксизащитные группы включают без ограничения: алкил, такой как метил, этил и трет-бутил; ацил, такой как алканоил (например, ацетил); арилметил, такой как бензил (Bn), p-метоксibenзил (PMB), 9-флуоренилметил (Fm) и дифенилметил (бензгидрил, DPM); силлил, такой как триметилсиллил (TMS) и трет-бутилдиметилсиллил (TBS), и т.п.

Соединения по настоящему изобретению могут быть получены различными способами синтеза, известными специалистам в данной области, включая конкретные варианты осуществления, перечисленные ниже, варианты осуществления, образованные путем их комбинирования с другими способами химического синтеза, и эквивалентные альтернативы, известные специалистам в данной области, при этом предпочтительные варианты осуществления включают без ограничения варианты осуществления настоящего изобретения.

Структура соединений по настоящему изобретению может быть подтверждена традиционными способами, известными специалистам в данной области, и если настоящее изобретение включает абсолютную конфигурацию соединения, то абсолютная конфигурация может быть подтверждена посредством традиционных методик из данной области техники. Например, в случае рентгеновской дифракции монокристаллов (SXRD) абсолютная конфигурация может быть подтверждена путем сбора данных об интенсивности дифракции культивируемого монокристалла с применением дифрактометра Bruker D8 venture с излучением CuK $\alpha$  в качестве источника света и с режимом сканирования: сканирование  $\phi/\omega$ ; а после сбора соответствующих данных кристаллическая структура может быть дополнительно проанализирована прямым методом (Shelxs97), чтобы можно было подтвердить абсолютную конфигурацию.

Используемый в настоящем изобретении растворитель является коммерчески доступным.

В настоящем изобретении используют следующие аббревиатуры.

Водн. означает водный;

НАТУ означает 2-(7-азабензотриазол)-N,N',N'-тетраметилурия гексафторфосфат;

экв. означает эквивалент;

DCM означает дихлорметан;

PE означает петролейный эфир;

DMSO означает диметилсульфоксид;

EtOAc означает этилацетат;

EtOH означает этанол;

MeOH означает метанол;

Cbz означает бензилоксикарбонил, который представляет собой аминозащитную группу;

Boc означает трет-бутоксикарбонил, который представляет собой аминозащитную группу;

к. т. означает комнатную температуру;

O/N означает в течение ночи;

THF означает тетрагидрофуран;  
 Вос<sub>2</sub>O означает ди-трет-бутилдикарбонат;  
 TFA означает трифторуксусную кислоту;  
 DIPEA означает диизопропилэтиламин;  
 iPrOH означает 2-пропанол; и  
 т. пл. означает точку плавления.

Соединения по настоящему изобретению названы согласно традиционным принципам номенклатуры в данной области техники или с помощью программного обеспечения ChemDraw®, а для коммерчески доступных соединений используются названия из каталога поставщика.

#### Краткое описание графических материалов

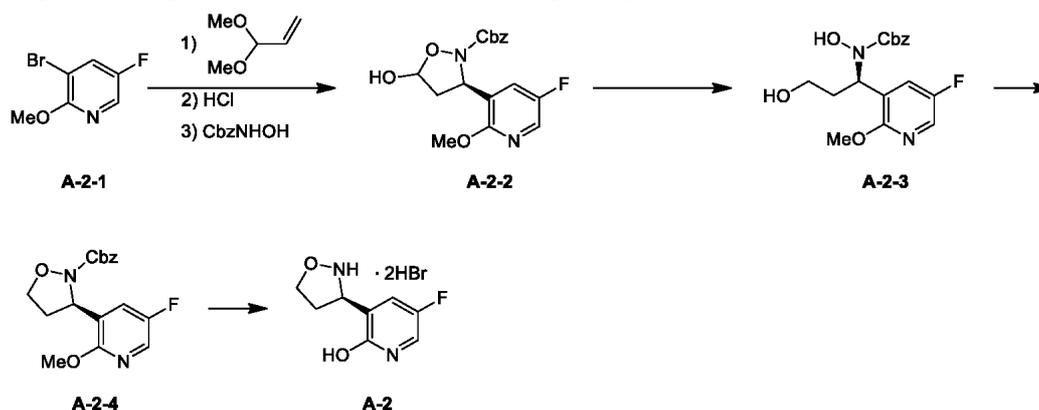
На фиг. 1 показана модель подкожного ксенотрансплантата опухоли Ва/F3 CD74-ROS1-WT; и среда-носитель означает контрольную группу, получавшую растворитель.

На фиг. 2 показана животная PDX-модель рака легкого человека LD1-0025-361019; контроль в виде среды-носителя представляет контрольную группу, получавшую растворитель.

#### Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Настоящее изобретение будет подробно описано ниже с помощью вариантов осуществления, но никакие неблагоприятные ограничения настоящего изобретения не подразумеваются. В данном документе подробно описано настоящее изобретение, а также были раскрыты его конкретные варианты осуществления. Для специалистов в данной области очевидно, что в конкретные варианты осуществления настоящего изобретения можно вносить различные изменения и улучшения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

Контрольный вариант осуществления 2. Синтез промежуточного соединения A-2.



Стадия 1. Синтез соединения A-2-2.

В трехгорлую колбу объемом 5 л при перемешивании добавляли соединение A-2-1 (170 г, 825,19 ммоль, 1 экв.) к смешанному растворителю из N,N-диметилформамида (850 мл) и воды (340 мл), а затем последовательно добавляли карбонат калия (171,07 г, 1,24 моль, 1,5 экв.), тетрабутиламмония ацетат (497,61 г, 1,65 моль, 2 экв.) и 3,3-диметоксипропилен (252,83 г, 2,48 моль, 3 экв.). После трехкратной замены азота добавляли ацетат палладия (2,55 г, 11,36 ммоль) и смесь медленно нагревали до 95°C в атмосфере азота (время нагрева составляло 1,5 ч), перемешивали и обеспечивали реакцию при указанной температуре в течение 16 ч. Реакционный раствор охлаждали до 5°C, затем по каплям добавляли водный раствор хлористоводородной кислоты (4 М, 860 мл, 4,17 экв.), а внутреннюю температуру контролировали на уровне от 10 до 20°C (время добавления по каплям составляло 25 мин); смесь перемешивали и обеспечивали непрерывное прохождение реакции при температуре от 20 до 25°C в течение 30 мин после добавления по каплям. В реакционную колбу медленно добавляли бикарбонат натрия, и значение pH регулировали до 6-7. После перемешивания в течение 20 мин реакционный раствор трижды экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (объем первой и второй экстракции составлял 1360 мл, а объем третьей экстракции составлял 850 мл). Все органические фазы объединяли, дважды промывали насыщенным раствором хлорида натрия (850 мл каждый раз), сушили безводным сульфатом натрия (170 г), фильтровали при пониженном давлении, а фильтрат концентрировали в вакууме при температуре от 45 до 50°C с получением концентрата. Концентрат суспендировали с использованием смешанного растворителя из п-гептана и метил-трет-бутилового эфира (510 мл; объемное соотношение н-гептана и метил-трет-бутилового эфира составляло 5,6: 1) в течение 10 мин, фильтровали и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением неочищенного продукта. Триметилсилиловый эфир (R)-дифенилпропиола (135,12 г, 415,09 ммоль, 0,2 экв.) растворяли в дихлорметане (1500 мл) и смесь охлаждали до температуры от 0 до 5°C. При перемешивании добавляли вышеуказанный неочищенный продукт и бензойную кислоту (50,69 г, 415,09 ммоль, 0,2 экв.) и смесь перемешивали при температуре от 0 до 5°C в течение 0,5 ч. Затем понижали температуру до значения от -5 до -7°C, добавляли бензил-N-гидроксикарбамат (416,33 г,

2,49 моль, 1,2 экв.) и смесь перемешивали и обеспечивали непрерывное прохождение реакции при температуре от -5 до 10°C в течение 4 ч. После завершения реакции реакционный раствор охлаждали до температуры от 0 до 5°C и фильтровали. Осадок на фильтре промывали дихлорметаном (500 мл) и осадок на фильтре сушили в вакууме при 45°C в течение 16 ч с получением соединения А-2-2.

$^2\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,98 (d,  $J=2,8$  Гц, 1H), 7,57 (dd,  $J=2,8, 8,2$  Гц, 1H), 7,46-7,37 (m, 5H), 5,86 (d,  $J=4,6$  Гц, 1H), 5,62 (t,  $J=7,8$  Гц, 1H), 5,30 (q,  $J=12,3$  Гц, 2H), 4,02 (s, 3H), 3,01 (dd,  $J=8,5, 12,9$  Гц, 1H), 2,21-2,13 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=349,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Стадия 2. Синтез соединения А-2-3.

Соединение А-2-2 (50 г, 143,54 ммоль, 1 экв.) добавляли к метанолу (250 мл) и смесь перемешивали, охлаждали до 0°C; порциями добавляли борогидрид натрия (6,79 г, 179,43 ммоль, 1,25 экв.), затем внутреннюю температуру контролировали на уровне 0-10°C; смесь перемешивали и обеспечивали прохождение реакции при температуре 20°C в течение 60 мин после завершения добавления. После завершения реакции добавляли к реакционному раствору 100 мл насыщенного раствора хлорида аммония для гашения реакции, затем добавляли 50 мл воды и реакционный раствор трижды экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром, по 200 мл каждый раз. Органические фазы объединяли, промывали один раз с помощью 300 мл насыщенного раствора хлорида натрия, сушили с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме при 45°C с получением соединения А-2-3.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,89 (d,  $J=2,8$  Гц, 1H), 7,68 (br s, 1H), 7,66 (dd,  $J=2,8, 8,4$  Гц, 1H), 7,42-7,27 (m, 5H), 5,52 (dd,  $J=4,8, 10,8$  Гц, 1H), 5,27-5,07 (m, 2H), 4,01-3,84 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,82-3,70 (m, 1H), 2,29-2,07 (m, 2H);

LCMS масса/заряд=351,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Стадия 3. Синтез соединения А-2-4.

Соединение А-2-3 (49 г, 139,86 ммоль, 1 экв.) растворяли в THF (250 мл) и к реакционному раствору добавляли трифенилфосфин (44,02 г, 167,84 ммоль, 1,2 экв.), по каплям добавляли диизопропилазоди-карбоксилат (42,42 г, 209,80 ммоль, 40,79 мл, 1,5 экв.) при 0°C, контролировали температуру реакции на уровне от 0 до 10°C и смесь перемешивали и обеспечивали непрерывное прохождение реакции при температуре от 0 до 10°C в течение 0,5 ч. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали в вакууме при 45°C. Концентрат перемешивали и суспендировали с использованием смешанного растворителя из метил-трет-бутилового эфира и н-гептана (100 мл; объемное соотношение метил-трет-бутилового эфира и н-гептана составляло 1:1) в течение 0,5 ч, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт разделяли и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (градиент элюирования: н-гептан:этилацетат=от 100:0 до 92:8) с получением соединения А-2-4.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,90 (d,  $J=3,0$  Гц, 1H), 7,50 (dd,  $J=2,4, 8,4$  Гц, 1H), 7,42-7,32 (m, 5H), 5,44 (dd,  $J=5,2, 8,6$  Гц, 1H), 5,31-5,18 (m, 2H), 4,20-4,09 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95-3,83 (m, 1H), 2,97-2,80 (m, 1H), 2,23-2,09 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=333,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

SFC (колонка: Chiralpak AD-3, 3 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А ( $\text{CO}_2$ ) и В (изопропанол, содержащий 0,05% диэтиламина); градиент: В % = 5-40%, 2 мин, выдерживание при 40%, 1,2 мин, затем 5%, 0,8 мин; скорость потока: 4 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 1500 фунт/кв. дюйм; время удерживания: 0,887 мин, ee % = 98,94%.

Стадия 4. Синтез соединения А-2.

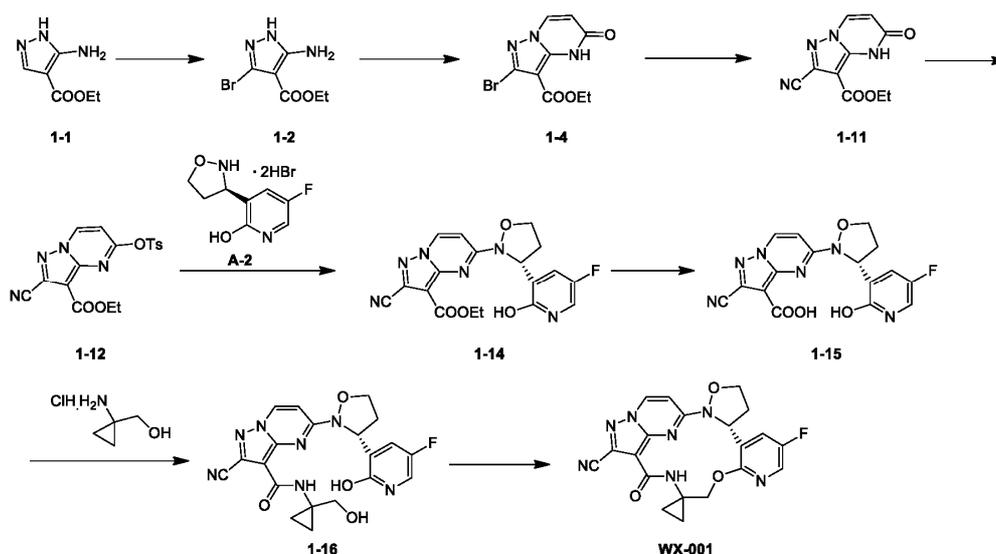
После растворения соединения А-2-4 (35 г, 105,32 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (175 мл) к полученному добавляли раствор бромистоводородной кислоты/уксусной кислоты (68 мл, 413,24 ммоль, массовая доля составляла 33%, 3,92 экв.). После перемешивания и обеспечения реакции при 25°C в течение 5 дней добавляли дополнительное количество раствора бромистоводородной кислоты/уксусной кислоты (51 мл, 3,0 экв.) и обеспечивали продолжение реакции в течение 1 дня. Под защитой азота реакционный раствор фильтровали при пониженном давлении. Затем осадок на фильтре промывали с помощью 30 мл метил-трет-бутилового эфира, осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения А-2 (идентифицировано посредством ионообменной хроматографии, содержание Вг соответствовало двум солям).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,93 (dd,  $J=2,4, 7,8$  Гц, 1H), 7,69 (t,  $J=3,2$  Гц, 1H), 5,13 (t,  $J=8,4$  Гц, 1H), 4,59 (dt,  $J=3,6, 7,8$  Гц, 1H), 4,41 (dt,  $J=6,0, 8,5$  Гц, 1H), 3,00-2,89 (m, 1H), 2,87-2,73 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=185,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

SFC (колонка: Chiralpak AD-3, 3 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А ( $\text{CO}_2$ ) и В (изопропанол, содержащий 0,05% диэтиламина); градиент: В % = 5-40% 5 мин, затем 40-5% 0,5 мин и в заключение выдерживание при 5% 1,5 мин; скорость потока: 2,5 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 1500 фунт/кв. дюйм; время удерживания: 3,624 мин, ee % = 98,32%.

## Вариант осуществления 1. Синтез соединения WX-001.



## Стадия 1. Синтез соединения 1-2.

К соединению 1-1 (300 г, 1,93 моль, 1 экв.) добавляли этилацетат (3000 мл) и карбонат калия (13,36 г, 96,68 ммоль, 0,05 экв.). Под защитой азота реакционный раствор охлаждали до  $-5^{\circ}\text{C}$ , а затем порциями добавляли N-бромсукцинимид (430,18 г, 2,42 моль, 1,25 экв.). Температуру реакции контролировали на уровне от  $-5$  до  $5^{\circ}\text{C}$  со временем дозирования 2,5 ч, а затем смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре ( $20^{\circ}\text{C}$ ). К реакционному раствору добавляли водный раствор сульфата натрия (полученный из 400 г безводного сульфата натрия и 2300 мл воды) и смесь непрерывно перемешивали в течение 10 мин. Фазы разделяли и органическую фазу промывали один раз с помощью 1000 мл насыщенного солевого раствора.

Органические фазы и водные фазы, полученные посредством такой же обработки данной партии и реакции другой параллельной партии (тот же масштаб: 300 г соединения 1-1), соответствующим образом объединяли для обработки. Водную фазу (суспензию) первого этапа разделяли фильтровали и фильтрат дважды экстрагировали этилацетатом (1500 мл каждый раз), а объединенную органическую фазу промывали один раз с помощью 2000 мл насыщенного солевого раствора. Все органические фазы объединяли, сушили с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и осадок на фильтре промывали этилацетатом (500 мл). Фильтрат концентрировали в вакууме при  $45^{\circ}\text{C}$  с получением 880 г твердого неочищенного продукта; неочищенный продукт перемешивали и суспендировали с использованием метанола (3960 мл) в течение 16 ч, фильтровали и осадок на фильтре промывали метанолом (300 мл), а фильтрат концентрировали в вакууме при  $45^{\circ}\text{C}$  с получением 780 г неочищенного продукта. Неочищенный продукт перемешивали и суспендировали с использованием метил-трет-бутилового эфира (780 мл) при комнатной температуре в течение 3 ч, фильтровали и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-2.

$^2\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,33 (br s, 2H), 4,26 (q,  $J=7,0$  Гц, 2H), 1,32 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H);

LCMS масса/заряд=233,8  $[\text{M}+1]^+$ .

## Стадия 2. Синтез соединения 1-4.

К N,N-диметилформамиду (2250 мл) последовательно добавляли соединение 1-2 (294 г, 1,26 моль, 1 экв.) и фосфат калия (399,95 г, 1,88 моль, 1,5 экв.), перемешивали, а затем к полученному добавляли этил-3-этоксикарилат (181,10 г, 1,26 моль, 181,46 мл, 1 экв.), смесь нагревали до  $125^{\circ}\text{C}$  и обеспечивали реакцию в течение 8 ч. После охлаждения до комнатной температуры к реакционному раствору добавляли 600 мл холодной воды, перемешивали в течение 5 мин, затем к реакционному раствору добавляли лед (2000 мл). К полученному медленно при перемешивании добавляли раствор хлористоводородной кислоты (3 M, 2000 мл) и регулировали pH до значения 2; смесь перемешивали в течение 10 мин, а затем фильтровали. Осадок на фильтре перемешивали и суспендировали с использованием воды (1000 мл) в течение 10 мин, затем фильтровали и полученный осадок на фильтре перемешивали и суспендировали с использованием метанола (1000 мл) в течение 20 мин. После фильтрации осадок на фильтре промывали метанолом (200 мл) и сушили в вакууме при  $45^{\circ}\text{C}$  с получением соединения 1-4.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,76 (br s, 1H), 7,97 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 6,09 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,34 (q,  $J=7,2$  Гц, 2H), 1,35 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H).

## Стадия 3. Синтез соединения 1-11.

Соединение 1-4 (50 г, 145,06 ммоль, 1 экв.) и цианид меди (32,48 г, 362,66 ммоль, 2,5 экв.) добавляли к N,N-диметилформамиду (250 мл), а затем смесь нагревали до  $125^{\circ}\text{C}$  для обеспечения реакции в течение 60 ч. После завершения реакции реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры, вы-

ливали в воду (500 мл) и перемешивали в течение 2 ч. Раствор смеси фильтровали при пониженном давлении и собирали осадок на фильтре и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-11.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,28 (br s, 1H), 8,68 (br d, J=8,0 Гц, 1H), 6,41 (br d, J=8,0 Гц, 1H), 4,34 (q, J=6,8 Гц, 2H), 1,31 (t, J=7,0 Гц, 3H).

Стадия 4. Синтез соединения 1-12.

Соединение 1-11 (34 г, 146,43 ммоль, 1 экв.), триэтиламин (44,45 г, 439,29 ммоль, 3 экв.) и 4-диметиламинопиридин (3,58 г, 29,29 ммоль, 0,2 экв.) последовательно добавляли к дихлорметану (300 мл) и систему заменяли азотом. Затем по каплям добавляли раствор дихлорметана (100 мл) и п-толуолсульфонилхлорида (69,79 г, 366,07 ммоль, 2,5 экв.) при 0°C. После завершения добавления реакционный раствор медленно нагревали до комнатной температуры, 20°C, для обеспечения реакции в течение 6 ч. После завершения реакции реакционный раствор выливали в воду (1500 мл), после этого к нему добавляли дихлорметан (2500 мл) и смесь перемешивали в течение 1 ч, а затем оставляли отстаиваться для разделения жидкости. После добавления воды (1500 мл) к органической фазе смесь перемешивали в течение 1 ч, оставляли отстаиваться для разделения жидкости и водную фазу удаляли. После добавления дихлорметана (1500 мл) к водной фазе первого этапа разделения жидкости смесь перемешивали в течение 1 ч и оставляли отстаиваться для разделения жидкости. Органические фазы двух этапов разделения жидкости объединяли, сушили с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт суспендировали и перемешивали с метанолом (150 мл) при комнатной температуре, 20°C, в течение 2 ч. После фильтрования осадок на фильтре промывали небольшим количеством метанола (3 мл) и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-12.

$^2\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,68 (d, J=7,2 Гц, 1H), 8,36 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,43 (d, J=8,0 Гц, 2H), 6,87 (d, J=7,6 Гц, 1H), 4,54 (q, J=7,0 Гц, 2H), 2,48 (s, 3H), 1,52 (t, J=7,2 Гц, 3H);

LCMS масса/заряд=387,0 [M+1] $^+$ .

Стадия 5. Синтез соединения 1-14.

К изопропанолу (10 мл) добавляли соединение А-2 (1,0 г, 2,89 ммоль, 1 экв.), затем к полученному добавляли соединение 1-12 (893,39 мг, 2,31 ммоль, 0,80 экв.), в заключение к полученному добавляли N,N-диизопропилэтиламин (1,12 г, 8,67 ммоль, 1,51 экв.) и смесь перемешивали при 40°C в течение 3 ч. После завершения реакции реакционную систему охлаждали до комнатной температуры, фильтровали с получением осадка на фильтре и осадок на фильтре суспендировали с использованием этилацетата (2 мл) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем фильтровали с получением соединения 1-14.

$^2\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,95 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,13 (d, J=8,0 Гц, 1H), 5,57-5,53 (m, 1H), 4,24-4,16 (m, 3H), 4,02-3,96 (m, 1H), 2,84-2,67 (m, 1H), 2,29-2,21 (m, 1H), 1,18 (t, J=7,2 Гц, 3H);

LCMS масса/заряд=399,1 [M+1] $^+$ .

Стадия 6. Синтез соединения 1-15.

Соединение 1-14 (8,7 г, 21,84 ммоль, 1 экв.) растворяли в смешанном растворителе из воды (22 мл) и тетрагидрофурана (65 мл), затем добавляли гидроксида лития моногидрат (3,67 г, 87,36 ммоль, 4 экв.) и систему заменяли азотом. Реакционная система изменялась с мутной на прозрачную, и ее перемешивали при 25°C в течение 4 ч. Реакционный раствор регулировали до pH 6-7 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты (15 мл) и обеспечивали осаждение твердого вещества. Систему фильтровали с использованием воронки и осадок на фильтре дважды промывали водой - каждый раз по 4 мл. Осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-15.

LCMS масса/заряд=371,0 [M+H] $^+$ .

SFC (колонка: Chiralpak AD-3, 3 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А ( $\text{CO}_2$ ) и В (EtOH с содержанием 0,05% диэтиламина); градиент: В %=5-50% 3 мин; скорость потока: 3,4 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 100 бар; время удерживания: 1,68 мин, ee %=100%.

Стадия 7. Синтез соединения 1-16.

Соединение 1-15 (33,4 г, 90,20 ммоль, 1 экв.) и 1-аминоциклопропанметанола гидрохлорид (12,26 г, 99,22 ммоль, 1,1 экв., HCl) растворяли в N,N-диметилформамиде (334 мл) и систему заменяли азотом, а затем добавляли НАТУ (37,73 г, 99,22 ммоль, 1,1 экв.). Систему снова заменяли азотом и добавляли N,N-диизопропилэтиламин (46,63 г, 360,79 ммоль, 62,84 экв.). Реакционная система изменялась с белой мутной на желтую прозрачную, а затем на желтую мутную, и ее перемешивали при 25°C в течение 3,5 ч. К реакционной системе добавляли насыщенный раствор хлорида аммония (3,34, 0,1 об.), а затем к полученному добавляли ацетонитрил (133,6 мл, 4 об.); смесь перемешивали в течение 30 мин и фильтровали через воронку Бюхнера, а осадок на фильтре трижды промывали ацетонитрилом - каждый раз по 10 мл. Собирали осадок на фильтре и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-16.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,86 (s, 1H), 8,98 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 7,11 (d, J=8,0 Гц, 1H), 5,42 (t, J=6,8, 1H), 4,59-4,58 (m, 1H), 4,34-4,30 (m, 1H), 4,08-4,03 (m, 1H), 3,47-3,38 (m, 2H), 3,03-2,95 (m, 1H), 2,25-2,18 (m, 1H), 0,74-0,68 (m, 2H), 0,60-0,57 (m, 1H), 0,35-0,32 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=440,1 [M+H] $^+$ .

SFC (колонка: (S,S)-WHELK-O1, 3,5 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А (CO<sub>2</sub>) и В (EtOH с содержанием 0,05% DEA); градиент: В %=5-50%, 3 мин; скорость потока: 3,4 мл/мин; длина волны: 220 нм; температура колонки: 35°C; давление колонки: 1800 фунт/кв. дюйм, время удерживания: 1,65 мин, ee %=100%.

Стадия 8. Синтез соединения WX-001.

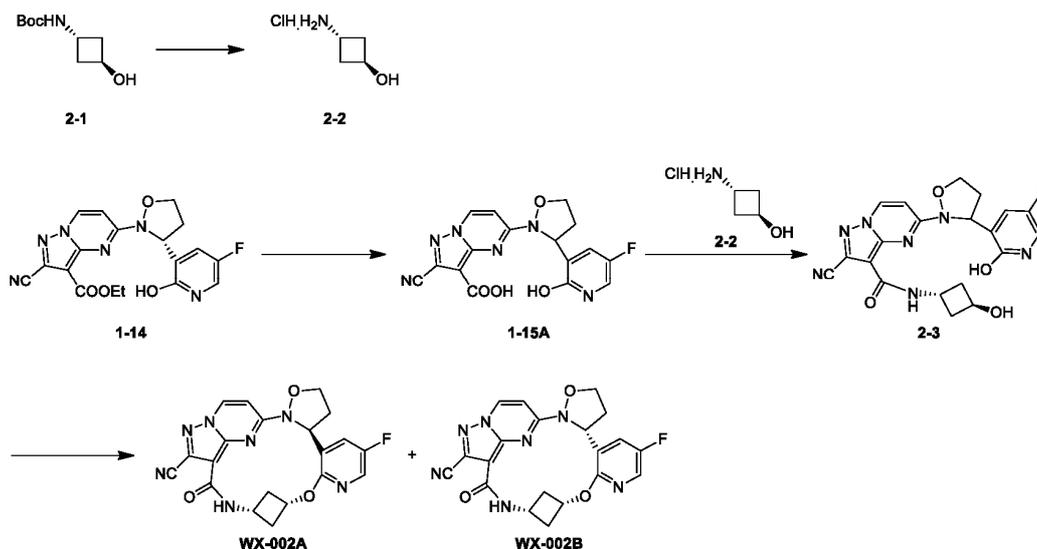
Соединение 1-16 (45 г, 102,41 ммоль, 1 экв.) растворяли в тетрагидрофуране (450 мл) и после замены системы азотом к полученному добавляли три-*n*-бутилфосфин (41,44 г, 204,83 ммоль, 50,54 мл, 2 экв.), затем к полученному добавляли азодикарбонилдипиперидин (51,68 г, 204,83 ммоль, 2 экв.); обеспечивали реакцию в смеси при 20°C в течение 3 ч. После объединения реакционной системы с другими двумя порциями реакционных систем (4,45+5 г), к системе добавляли метанол (220 мл, 4 об.); после перемешивания в течение 30 мин получали путем фильтрования твердый осадок на фильтре, а затем твердый осадок на фильтре трижды суспендировали с использованием метанола (165 мл, 5 об.) при комнатной температуре и каждый раз фильтровали после перемешивания в течение 30 мин. Собирали осадок на фильтре и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения WX-001.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,26 (s, 1H), 8,98 (d, J=8,0 Гц, 1H), 8,16 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,89 (dd, J=8,4 Гц, 2,8 Гц, 1H), 7,04 (d, J=8,0 Гц, 1H), 5,97 (t, J=8,4, 1H), 4,76 (d, J=10,8 Гц, 1H), 4,59 (t, J=7,2 Гц, 1H), 4,02-3,99 (m, 1H), 3,91 (d, J=10,8 Гц, 1H), 3,07 -3,01 (m, 1H), 2,63-2,57 (m, 1H), 2,13-2,08 (m, 1H), 1,28-1,24 (m, 1H), 0,98-0,89 (m, 2H);

LCMS масса/заряд=422,1 [M+H]<sup>+</sup>.

SFC (колонка: Chiralcel OD-3, 3 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А (CO<sub>2</sub>) и В (MeOH с содержанием 0,05% изопропиламина); градиент: В %=10-40%, 3 мин; скорость потока: 4,0 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 100 бар; время удерживания: 2,03 мин, ee %=100%.

Вариант осуществления 2. Синтез соединения WX-002A и WX-002B.



Стадия 1. Синтез соединения 2-2.

Соединение 2-1 (0,2 г, 1,07 ммоль, 1 экв.) растворяли в этилацетате (0,5 мл), затем к полученному добавляли хлористоводородную кислоту/этилацетат (2 мл, 4 М) и обеспечивали реакцию в смеси при комнатной температуре, 20°C, в течение 10 мин. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении при 45°C с получением соединения 2-2 (неочищенный продукт).

<sup>2</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,34 (br s, 3H), 5,12 (br s, 1H), 4,47-4,40 (m, 1H), 3,68-3,60 (m, 1H), 2,35-2,27 (m, 2H), 2,15-2,09 (m, 2H).

Стадия 2. Синтез соединения 1-15A.

Соединение 1-14 (1,4 г, 3,51 ммоль, 1 экв.) растворяли в ацетонитриле (70 мл), затем к полученному добавляли оксид алюминия (1,47 г, 14,41 ммоль, 4,1 экв.) и триметилсиликонат калия (901,76 мг, 7,03 ммоль, 2 экв.), систему заменяли азотом, нагревали до 80°C и перемешивали в течение 3 ч. После добавления дополнительного количества триметилсиликоната калия (90,18 мг, 0,703 ммоль, 0,2 экв.) перемешивание продолжали при 80°C в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную систему фильтровали и осадок на фильтре дважды промывали ацетонитрилом, каждый раз по 1,0 мл, и полученный осадок на фильтре представлял собой неочищенный продукт. Неочищенный продукт суспендировали с использованием смешанного растворителя (17,5 мл ацетонитрила и 3,5 мл метанола) при комнатной температуре, фильтровали и осадок на фильтре сушили в вакууме с получением соединения 1-15A.

LCMS масса/заряд=371,0 [M+H]<sup>+</sup>.

SFC (колонка: Chiralpak AD-3, 3 мкм, внутренний диаметр 0,46 см×длина 5 см; подвижная фаза: А (CO<sub>2</sub>) и В (EtOH с содержанием 0,05% диэтиламина); градиент: В %=5-50% 3 мин; скорость потока: 3,4 мл/мин; длина волны: 220 нм; давление: 100 бар; время удерживания: 1,68 мин; ee %=79,56% указывает на то, что при данных условиях продукт был частично рацемическим).

Стадия 3. Синтез соединения 2-3.

Соединение 1-15А (570 мг, 769,66 мкмоль, 1 экв.) растворяли в N,N-диметилформамиде (12 мл), а затем добавляли НАТУ (234,12 мг, 615,73 мкмоль, 0,8 экв.), соединение 2-2 (73,76 мг, 596,84 мкмоль, HCl) и N,N-диизопропилэтиламин (298,41 мг, 2,31 ммоль, 3 экв.) и обеспечивали реакцию в реакционном растворе при комнатной температуре, 20°C, в течение 1 ч. После добавления 2 капель воды к реакционной системе для гашения реакции реакционный раствор концентрировали в вакууме при 45°C с получением остатка. Остаток разделяли и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюент: дихлорметан:метанол=100:0-90:10) с получением соединения 2-3.

LCMS масса/заряд=440,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Стадия 4. Синтез соединений WX-002A и WX-002B.

Соединение 2-3 (70 мг, 159,31 мкмоль, 1 экв.) растворяли в тетрагидрофуране (3 мл), а затем последовательно добавляли трифенилфосфин (125,36 мг, 477,93 мкмоль, 3 экв.) и диизопропилазодикарбоксилат (96,64 мг, 477,93 мкмоль, 3 экв.), смесь перемешивали и обеспечивали реакцию при комнатной температуре, 20°C, в течение 1 ч после завершения добавления. После добавления 2 капель воды к реакционной системе для гашения реакции реакционный раствор концентрировали в вакууме с получением остатка. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюентом представлял собой смесь дихлорметан:метанол=100:0-90:10) с получением неочищенного продукта. Вышеуказанный неочищенный продукт суспендировали и перемешивали со смешанным раствором из 1 мл дихлорметана и 1 мл метанола в течение 10 мин, смесь фильтровали, а затем осадок на фильтре сушили в вакууме с получением продукта. Продукт разделяли с помощью SFC (хроматографическая колонка: REGIS (s,s) WHELK-01 (250×50 мм, 10 мкм); подвижная фаза: А: CO<sub>2</sub>; В: [MeOH с 0,1% аммиака]; градиент В %: 53-53%). Получали соединение WX-002A и соединение WX-002B.

WX-002A: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,14 (d, J=10,4 Гц, 1H), 8,42 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,98 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,59-7,56 (m, 1H), 7,05 (d, J=7,2 Гц, 1H), 6,15 (t, J=8,0 Гц, 1H), 5,29-5,26 (m, 1H), 4,97-4,90 (m, 1H), 4,56 (t, J=8,0 Гц, 1H), 3,98-3,91 (m, 1H), 3,15-3,05 (m, 2H), 3,02-2,96 (m, 1H), 2,55-2,45 (m, 1H), 2,27-2,22 (m, 1H), 1,92-1,87 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=422,1 [M+H]<sup>+</sup>.

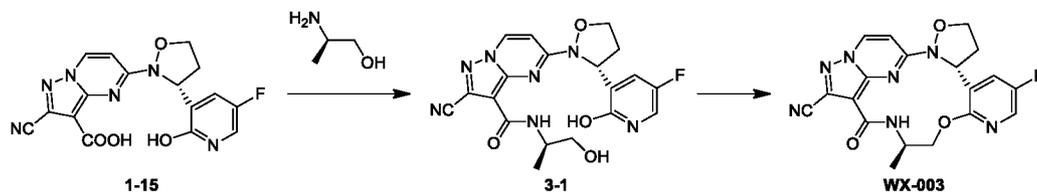
SFC (колонка: REGIS (s,s) WHELK-01 (50×4,6 мм, 3 мкм); подвижная фаза: А: CO<sub>2</sub>; В: [MeOH с 0,05% диэтиламина]; затем градиент В % увеличивали с 5 до 50% за 1,2 мин, выдерживали В %=50% в течение 1 мин, а затем понижали с 50 до 5% за 0,8 мин); скорость потока: 3,4 мл/мин; температура: 35°C; давление: 100 бар; время удерживания: 2,243 мин, ee %=97,60%.

WX-002B: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,14 (d, J=10,4 Гц, 1H), 8,42 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,98 (d, J=3,2 Гц, 1H), 7,59-7,56 (m, 1H), 7,05 (d, J=7,2 Гц, 1H), 6,15 (t, J=8,0 Гц, 1H), 5,30-5,26 (m, 1H), 4,97-4,92 (m, 1H), 4,56 (t, J=7,6 Гц, 1H), 3,97-3,91 (m, 1H), 3,15-3,05 (m, 2H), 3,02-2,96 (m, 1H), 2,55-2,45 (m, 1H), 2,27-2,22 (m, 1H), 1,92-1,87 (m, 1H);

LCMS масса/заряд=422,2 [M+H]<sup>+</sup>.

SFC (колонка: REGIS (s,s) WHELK-01 (50×4,6 мм, 3 мкм); подвижная фаза: А: CO<sub>2</sub>; В: [MeOH с 0,05% диэтиламина]; затем градиент В % увеличивали с 5 до 50% за 1,2 мин, выдерживали В %=50% в течение 1 мин, а затем понижали с 50 до 5% за 0,8 мин); скорость потока: 3,4 мл/мин; температура: 35°C; давление: 100 бар; время удерживания: 2,440 мин, ee %=95,98%.

Вариант осуществления 3. Синтез соединения WX-003.



Стадия 1. Синтез соединения 3-1.

Соединение 1-15 (200,0 мг, 489,73 мкмоль, 1 экв.) и (R)-(-)-2-амино-1-пропанол (36,78 мг, 489,73 мкмоль, 1 экв.) растворяли в N,N-диметилформамиде (4 мл) и к полученному добавляли НАТУ (148,97 мг, 391,79 мкмоль, 0,8 экв.). Затем в атмосфере азота добавляли диизопропилэтиламин (189,88 мг, 1,47 ммоль, 3 экв.). После завершения добавления реакционный раствор перемешивали при 25°C в течение 9 ч. Реакционный раствор непосредственно концентрировали в вакууме с получением остатка, и остаток разделяли и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюент: метанол:дихлорметан=от 0 до 1:1) с получением соединения 3-1.

LCMS масса/заряд=428,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Стадия 2. Синтез соединения WX-003.

Соединение 3-1 (67 мг, 156,77 мкмоль, 1 экв.) растворяли в дихлорметане (2 мл), затем к полученному добавляли трифенилфосфин (123,35 мг, 470,30 мкмоль, 3 экв.). После этого систему заменяли азотом, добавляли диэтилазодикарбоксилат (81,90 мг, 470,30 мкмоль, 3 экв.) и смесь перемешивали при 25°C в течение 7 ч после завершения добавления. После добавления в реакционный раствор 3 капель воды для гашения реакции реакционный раствор концентрировали в вакууме, концентрированный остаток разделяли и очищали методом препаративной тонкослойной хроматографии на силикагелевой пластине (проявляющее вещество: этилацетат) с получением соединения WX-003.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,53 (d, J=7,2 Гц, 1H), 8,39 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,98 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,57-7,54 (m, 1H), 6,95 (d, J=7,6 Гц, 1H), 6,04-6,00 (m, 1H), 4,69 (dd, J=10,8, 4,0 Гц, 1H), 4,61-4,57 (m, 1H), 4,48-4,45 (m, 1H), 4,31-4,25 (m, 1H), 4,04-3,97 (m, 1H), 3,14-3,07 (m, 1H), 2,64-2,55 (m, 1H), 1,53 (d, J=6,4 Гц, 3H);

LCMS масса/заряд=410,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Данные испытаний.

Экспериментальный вариант осуществления 1. Ингибирующая активность соединений в отношении киназы TrkA и ROS1.

Ингибирующую активность соединений в отношении киназы TrkA и ROS1 исследовали в Reaction Biology Corp. Company. Определенную концентрацию субстрата, коферментного фактора, киназы и исследуемых соединений (10 доз, 3-кратное серийное разведение, конечная концентрация DMSO 2%) последовательно добавляли к реакционному буферу (20 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0,02% Brij35, 0,02 мг/мл BSA, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 1% DMSO) и хорошо перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. К реакционной смеси добавляли определенную концентрацию <sup>33</sup>P-АТФ для запуска реакции, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 120 мин. В заключение определяли радиоактивность реагентов методом связывания на фильтрах. Конечную активность киназы выражали как соотношение остаточной активности киназы в испытуемом образце и активности киназы контрольной группы DMSO. Кривую зависимости доза-эффект строили с помощью программного обеспечения GraphPad и рассчитывали IC<sub>50</sub>. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Полуингибирующая концентрация киназы IC<sub>50</sub> (нМ)

	Соединение	ROS1	ROS1-G2032R	TrkA	ALK
1	<b>TPX-0005</b>	0,2	0,2	3,7	2,3
2	<b>WX-001</b>	0,8	0,3	231,0	103
4	<b>WX-002B</b>	0,2	0,1	597	25,1
5	<b>WX-003</b>	1,6	0,7	435	136

Результаты показывали, что соединение по настоящему изобретению проявляло высокую ингибирующую активность в отношении киназы на примере киназы ROS1 и ее мутанта ROS1-G2032R, которая была сопоставима с активностью TPX-0005. Тем не менее соединение по настоящему изобретению характеризовалось слабой ингибирующей активностью в отношении киназ TrkA и ALK, что показывает высокую селективность, которая значительно лучше селективности TPX-0005.

Экспериментальный вариант осуществления 2. Ингибирующая активность соединений в отношении клеточной пролиферации.

Аденозинтрифосфат (АТФ) является универсальным переносчиком энергии для всех видов жизнедеятельности в природе и представляет собой наименьшую единицу хранения и передачи энергии. В наборе реагентов для определения количества жизнеспособных клеток CellTiter-Glo™ в качестве вещества для обнаружения использовали люциферазу, а люцифераза требует участия АТФ в процессе люминесценции. Реагент CellTiter-Glo™ добавляли к среде для культивирования клеток и измеряли значение люминесценции. Световой сигнал был прямо пропорциональным уровню АТФ в системе, и АТФ положительно коррелировал с количеством жизнеспособных клеток. Таким образом, с помощью набора CellTiter-Glo можно определить пролиферацию клеток путем определения содержания АТФ. В данном испытании линии клеток представляли собой стабильно трансфицированные линии клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-WT, Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R, Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT, при этом количество клеток составляло 5000 клеток/лунка.

Процесс определения IC<sub>50</sub>.

1. Культура клеток и инокуляция.

а) Клетки в логарифмической фазе роста собирали и подсчитывали с применением счетчика тромбоцитов. Жизнеспособность клеток определяли методом вытеснения трипанового синего с обеспечением жизнеспособности клеток выше 90%.

б) Регулировали концентрацию клеток; 90 мкл суспензии клеток соответствующим образом добавляли в 96-луночный планшет.

в) Клетки в 96-луночном планшете культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95%.

2. Разбавление и дозирование лекарственного средства.

а) Готовили 10-кратный раствор лекарственного средства с максимальной концентрацией 10 мкМ, 9 концентраций и 3-кратное разбавление; в каждую лунку 96-луночного планшета, засеянного клетками, добавляли по 10 мкл раствора лекарственного средства, и для каждой концентрации лекарственного препарата было предусмотрено три повторяющиеся лунки.

б) Клетки в 96-луночном планшете с дозированным лекарственным средством дополнительно инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95% в течение 72 ч, а затем проводили анализ СТГ.

3. Считывание конечной точки планшета.

а) Обеспечивали оттаивание СТГ-реагента и уравнивание планшета с клетками до достижения комнатной температуры в течение 30 мин.

б) В каждую лунку добавляли равный объем СТГ-раствора.

в) Клетки подвергали лизису путем встряхивания на орбитальном шейкере в течение 5 мин.

д) Планшет с клетками помещали в условия комнатной температуры на 20 мин для стабилизации люминесцентного сигнала.

е) Проводили считывание значения люминесценции.

4. Обработка данных.

Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 и получали кривую зависимости доза-эффект путем аппроксимации данных с применением нелинейной регрессии S-кривой, из которой рассчитывали значения IC<sub>50</sub>. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Полуингибирующая концентрация клеток IC<sub>50</sub> (нМ)

	Соединение	Ba/F3 SLC34A2-ROS1	Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R	Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT
1	TPX-0005	1,9	13,0	1,1
2	WX-001	4,6	5,6	37,0
3	WX-002B	24	20	157
4	WX-003	11	9,3	43

Результаты показали, что соединения по настоящему изобретению проявляют высокую ингибирующую активность в отношении клеточной пролиферации на примере слитой с ROS1 линии клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1 и ее мутантной линии клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R. При этом соединения по настоящему изобретению проявляли слабую ингибирующую активность в отношении линии клеток Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT, и по сравнению с линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1 и линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R, особенно линией клеток Ba/F3 SLC34A2-ROS1-G2032R, проявляли значительную ингибирующую селективность.

Экспериментальный вариант осуществления 3. Кассетное фармакокинетическое исследование соединений на мышах.

Цель эксперимента. Изучение фармакокинетических свойств соединений по настоящему изобретению на мышах и оценка их фармакокинетических характеристик с использованием самцов мышей CD-1 возрастом 7-9 недель в качестве подопытных животных и с применением способа LC/MS/MS для определения концентрации соединений лекарственного средства в плазме крови в разное время после однократного внутривенного введения (IV) и введения через желудочный зонд (PO).

Приготовление лекарственного средства. Соединения вводили в состав прозрачных растворов, содержащих 5% DMSO+10% солютола+85% воды, в качестве растворителя для группы IV (внутривенного) введения и введения через желудочный зонд (PO). Способом дозирования было кассетное дозирование, при этом доза каждого соединения при IV введении составляла 0,5 мг/кг, а доза при PO введении составляла 2,5 мг/кг. Результаты фармакокинетических параметров представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты кассетных фармакокинетических исследований на мышах

		Кризотиниб	Энтректиниб	Лорлатиниб	TPX-0005	WX-001
IV при 0,5 мг/кг	Начальная концентрация C <sub>0</sub> (нМ)	776	1280	905	936	994
	Период полувыведения T <sub>1/2</sub> (ч)	2,54	2,52	2,39	4,38	1,66
	Кажущийся объем распределения Vd (л/кг)	4,93	1,39	1,79	5,26	0,551
	Скорость кажущегося клиренса Cl (мл/кг/мин)	30,3	6,83	9,96	18,0	3,43

	Площадь под кривой $AUC_{0-last}$ (нМ.ч)	562	1912	1896	1282	5645
РО при 2,5 мг/кг	Пиковая концентрация $C_{max}$ (нМ)	311	690	3225	3360	5380
	Время достижения пика $T_{max}$ (ч)	2,00	2,00	0,500	0,500	0,500
	Площадь под кривой $AUC_{0-last}$ (нМ.ч)	1838	4363	13537	10602	25273
	Биодоступность $F$ , %	65,4%	45,7%	143%	166%	89,8%
	Концентрация лекарственного средства в головном мозге через 0,5 часа Головной мозг, через 0,5 ч (нмоль/кг)	НО	12,7	622	42,2	486
	Концентрация лекарственного средства в головном мозге через 2 часа Головной мозг, через 2 ч (нмоль/кг)	20,8	38,9	896	86,2	664
	Концентрация лекарственного средства в цереброспинальной жидкости через 0,5 часа ЦСЖ, через 0,5 ч (нмоль/кг)	НО	НО	105	5,46	26,9
	Концентрация лекарственного средства в цереброспинальной жидкости через 2 часа ЦСЖ, через 2 ч (нмоль/кг)	НО	НО	145	НО	36,4
	Концентрация лекарственного средства в легком через 0,5 часа Легкое, через 0,5 ч (нмоль/кг)	693	876	1344	1131	1770
	Концентрация лекарственного средства в легком через 2 часа Легкое, через 2 ч (нмоль/кг)	5088	5958	2016	1434	2862

"НО": не обнаружено.

Результаты показали следующее: при одинаковой дозировке общее системное воздействие и пиковая концентрация соединения WX-001 по настоящему изобретению после перорального введения были значительно выше таковых для кризотиниба, энтретиниба, лорлатиниба и TRX-005, и его скорость кажущегося клиренса была значительно ниже, чем у кризотиниба, энтретиниба, лорлатиниба и TRX-005, что указывает на превосходные фармакокинетические характеристики. По сравнению с энтретинибом и лорлатинибом концентрация соединения по настоящему изобретению в головном мозге и цереброспинальной жидкости была значительно выше, чем концентрация энтретиниба, и сопоставима с лорлатинибом через 0,5 и 2 ч после введения. По сравнению с TRX-0005 значения концентрации соединения по настоящему изобретению в легком, головном мозге и цереброспинальной жидкости были значительно выше в двух временных точках, через 0,5 и 2 ч после введения.

Экспериментальный вариант осуществления 4. Фармакокинетическое исследование соединений на мышах.

Цель эксперимента. Изучение фармакокинетических свойств соединений по настоящему изобретению на мышах и оценка их фармакокинетических характеристик с использованием самцов мышей CD-1 возрастом 7-9 недель в качестве подопытных животных и с применением способа LC/MS/MS для определения концентрации соединений лекарственного средства в плазме крови в разное время после одно-

кратного внутривенного введения (IV) и введения через желудочный зонд (PO).

Приготовление лекарственного средства. Соединения вводили в состав прозрачных растворов, содержащих 10% DMSO+10% солютола+80% воды, в качестве растворителя для группы IV (внутривенного) введения и введения через желудочный зонд (PO). Доза каждого соединения при IV введении составляла 1 мг/кг; а доза при PO введении составляла 3 мг/кг. Результаты фармакокинетических параметров представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты фармакокинетических исследований на мышах

		WX-002B	WX-003
IV	Период полувыведения, $T_{1/2}$ (ч)	2,1	3,2
	Кажущийся объем распределения, $V_d$ (л/кг)	1,1	1,0
	Скорость кажущегося клиренса, $Cl$ (мл/кг/мин)	6,3	4,0
	Площадь под кривой, $AUC_{0-last}$ (нМ.ч)	5873	8665
PO	Пиковая концентрация, $C_{max}$ (нМ)	2170	3805
	Время достижения пика, $T_{max}$ (ч)	1,5	3,0
	Площадь под кривой, $AUC_{0-last}$ (нМ.ч)	13350	23771
	Биодоступность, $F$ %	76%	92%

Результаты показали следующее: все из показателей общего системного воздействия, пиковой концентрации и биодоступности соединений по настоящему изобретению после перорального введения были высокими, что указывает на превосходные фармакокинетические характеристики.

Экспериментальный вариант осуществления 5. Исследование эффективности соединений на мышах.

Цель эксперимента. Оценка *in vivo* эффективности WX-001 на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли Ва/F3 CD74-ROS1-WT голых мышей BALB/c.

Приготовление лекарственного средства. Соединения вводили в состав прозрачных растворов, содержащих 10% DMSO+10% солютола+80% воды, в качестве растворителя для группы PO введения (через желудочный зонд).

Измерение опухоли. Диаметры опухолей измеряли штангенциркулем дважды в неделю. Формула расчета объема опухоли была следующей:

$$V=0,5 \times a \times b^2,$$

где  $a$  и  $b$  означают размеры опухоли по длинной и короткой оси соответственно.

Противоопухолевую эффективность соединений оценивали по TGI (%) или относительной скорости пролиферации опухоли T/C (%). TGI (%) степень подавления роста опухоли. Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%)= $T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$  ( $T_{RTV}$ : среднее значение RTV в группе обработки;  $C_{RTV}$ : среднее значение RTV в группе отрицательного контроля). Относительный объем опухоли (RTV) рассчитывали согласно результатам измерения опухоли, при этом расчетная формула была следующей:

$$RTV=V_t/V_0,$$

где  $V_0$  - объем опухоли, измеренный на момент введения группы (т.е. D0);

$V_t$  - объем опухоли соответствующей мыши при определенном измерении,

и данные  $T_{RTV}$  и  $C_{RTV}$  получали в один и тот же день.

$TGI$  (%)= $[(1-(\text{средний объем опухоли в конце введения в определенной группе обработки}-\text{средний объем опухоли в начале введения в данной группе обработки})) / (\text{средний объем опухоли в конце обработки в контрольной группе, получавшей растворитель}-\text{средний объем опухоли в начале обработки в контрольной группе, получавшей растворитель})] \times 100\%$

Результаты представлены на фиг. 1.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения SPSS на основе относительного объема опухоли и массы опухоли в конце испытания. Сравнение нескольких групп анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Если дисперсия была однородной (F-значения в значительной степени не отличались), для анализа применяли метод Тьюки. Если дисперсия была неоднородной (F-значения в значительной степени отличались), для исследования использовали метод Геймса-Хоуэлла.  $P < 0,05$  считали значимой разницей.

Результаты экспериментов. На модели подкожного ксенотрансплантата опухоли Ва/F3 CD74-ROS1-WT значения TGI кризотиниба (30 мг/кг) и WX-001 (10 мг/кг) через 7 дней после введения составляли 110,40 и 112,17% соответственно, и все  $p$ -значения были равны 0,004, что указывало на значительные противоопухолевые эффекты.

Заключение по эксперименту. WX-001 оказывало значительное ингибирующее действие на рост трансплантированной опухоли Ва/F3 CD74-ROS1-WT голых мышей.

Экспериментальный вариант осуществления 6. Исследование эффективности соединений на мышах.

Цель эксперимента. Оценить противоопухолевый эффект WX-001 в животной PDX-модели рака легкого человека LD1-0025-361019.

Приготовление лекарственного средства. Соединения вводили в состав прозрачных растворов, содержащих 10% DMSO+10% солютола+80% воды, в качестве растворителя для группы PO введения (через желудочный зонд).

Измерение опухоли: диаметры опухолей измеряли штангенциркулем дважды в неделю. Формула расчета объема опухоли была следующей:

$$V=0,5 \times a \times b^2,$$

где а и b означают размеры опухоли по длинной и короткой оси соответственно.

Противоопухолевую эффективность соединений оценивали с помощью TGI (%). TGI (%) степень подавления роста опухоли.

$$TGI (\%) = \left[ \frac{(1 - (\text{средний объем опухоли в конце введения в определенной группе обработки} - \text{средний объем опухоли в начале введения в данной группе обработки}))}{(\text{средний объем опухоли в конце обработки в контрольной группе, получавшей растворитель} - \text{средний объем опухоли в начале обработки в контрольной группе, получавшей растворитель})} \right] \times 100\%$$

Результаты представлены на фиг. 2.

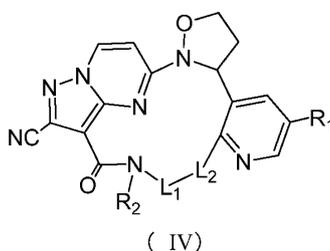
Статистический анализ. Все данные были выражены как среднее значение  $\pm$  SEM. Проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с определением наименьшей значимой разности (LSD) для сравнения того, имелась ли значимая разница в объеме опухоли и массе опухоли между группой обработки и контрольной группой. Все данные анализировали с применением Graphpad.  $P < 0,05$  считали значимой разницей.

Результаты экспериментов. Через 21 день после обработки животной PDX-модели рака легкого человека LD1-0025-361019 (слияние CD74-ROS1 и мутация G2032R), значения степени подавления роста опухоли TGI группы, которой вводили кризотиниб (50 мг/кг), группы, которой вводили высокую дозу WX-001 (20 мг/кг), группы, которой вводили среднюю дозу WX-001 (15 мг/кг), и группы, которой вводили низкую дозу WX-001 (10 мг/кг), составляли 35,43, 82,38, 70,03 и 60,83% соответственно. По сравнению с контрольной группой, получавшей растворитель, все из группы, которой вводили 20 мг/кг WX-001, группы, которой вводили 15 мг/кг WX-001, и группы, которой вводили 10 мг/кг WX-001, демонстрировали значительное ингибирующее действие на рост опухоли ( $P < 0,01$ ).

Заключение по эксперименту. В случае животной PDX-модели рака легкого человека LD1-0025-361019 WX-001 характеризуется значительным противоопухолевым действием, причем противоопухолевое действие имеет дозозависимую тенденцию ( $p < 0,05$  при сравнении группы с высокой дозой с группой с низкой дозой).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное формулой (IV), его фармацевтически приемлемая соль или его стереоизомер,



где R<sub>1</sub> представляет собой F;

R<sub>2</sub> представляет собой H;

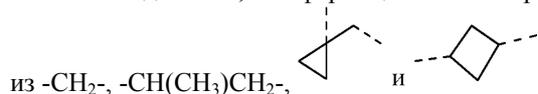
L<sub>1</sub> выбран из -C<sub>1-3</sub>алкил-, -C<sub>3-6</sub>циклоалкил- и -C<sub>3-6</sub>циклоалкил-C<sub>1-3</sub>алкил-, при этом -C<sub>1-3</sub>алкил- необязательно замещен с помощью одного R<sub>c</sub>;

L<sub>2</sub> представляет собой -O-;

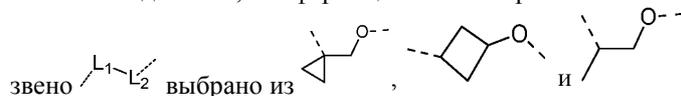
R<sub>c</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>.

2. Соединение, его фармацевтически приемлемая соль или его стереоизомер по п.1, где L<sub>1</sub> выбран из -CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -циклопропил-CH<sub>2</sub>- и -циклобутил-, при этом -CH<sub>2</sub>- и -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- необязательно замещены с помощью одного R<sub>c</sub>.

3. Соединение, его фармацевтически приемлемая соль или его стереоизомер по п.2, где L<sub>1</sub> выбран



4. Соединение, его фармацевтически приемлемая соль или его стереоизомер по п.1, где структурное

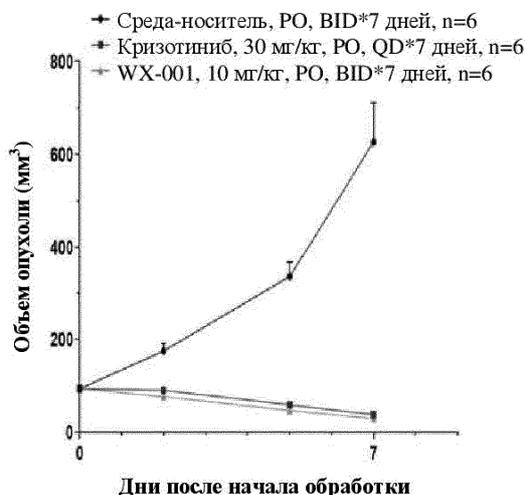




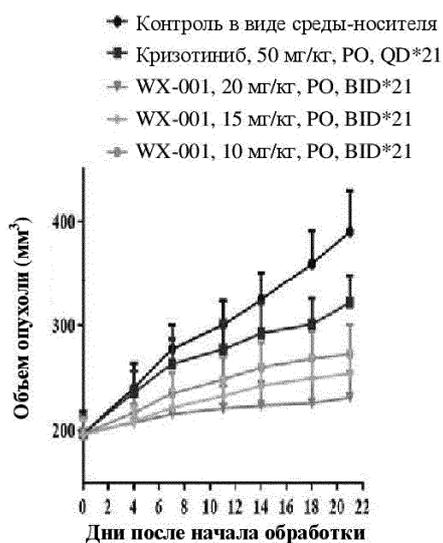
бому из пп.1-8 для изготовления лекарственного препарата, связанного с ингибитором рецепторной тирозинкиназы c-Ros онкоген 1.

10. Применение по п.9, где лекарственный препарат, связанный с ингибитором рецепторной тирозинкиназы c-Ros онкоген 1, представляет собой лекарственный препарат для лечения рака.

11. Применение по п.10, где лекарственный препарат, связанный с ингибитором рецепторной тирозинкиназы c-Ros онкоген 1, представляет собой лекарственный препарат для лечения рака легкого.



Фиг. 1



Фиг. 2

